

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2001年10月18日 (18.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/76614 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 35/78, 31/216, 31/7048, 31/192,  
31/12, A61P 43/00, 25/00, A23L 2/00, 1/30, A23K 1/16

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/03074

(22) 国際出願日: 2001年4月10日 (10.04.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-108602 2000年4月10日 (10.04.2000) JP  
特願2000-308522 2000年10月6日 (06.10.2000) JP  
特願2001-19167 2001年1月26日 (26.01.2001) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 寶酒  
造株式会社 (TAKARA SHUZO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒  
612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto  
(JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大野木宏  
(OHNOGI, Hiromu) [JP/JP]; 〒617-0002 京都府向日市  
寺戸町洪川16-A-406 Kyoto (JP). 白髪正宏 (SHIRAGA,  
Masahiro) [JP/JP]; 〒520-2134 滋賀県大津市瀬田  
2-1-15-103 Shiga (JP). 小林英二 (KOBAYASHI, Eiji)  
[JP/JP]; 〒520-2153 滋賀県大津市一里山六丁目18-19  
Shiga (JP). 西村香織 (NISHIMURA, Kaori) [JP/JP]; 〒  
520-0853 滋賀県大津市蛸谷1-13-205 Shiga (JP). 李  
拖平 (LI, Tuo-Ping) [CN/JP]; 〒520-2193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内  
Shiga (JP). 佐川裕章 (SAGAWA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒  
525-0025 滋賀県草津市西波川二丁目6-32 Shiga (JP).  
加藤郁之進 (KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒611-0028 京  
都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto (JP).(74) 代理人: 弁理士 細田芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒  
540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大  
手前M2ビル 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,  
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,  
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).添付公開書類:  
— 国際調査報告書2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDIES

(54) 発明の名称: 治療剤

(57) Abstract: Compositions for potentiating growth factor production which contain a growth factor production potentiator originating in a plant; remedies or preventives for diseases, wherein the production of growth factor should be potentiated, and foods, drinks or feeds for potentiating the production of growth factor each containing the above compositions; and functional foods, drinks or feeds excellent for improving health.

(57) 要約:

本発明は、植物由来の成長因子産生増強物質を含有する成長因子産生増強用組成物、該組成物を含有する、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療剤又は予防剤、成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料を提供する。また、本発明は、健康増強に優れた機能性食品、飲料又は飼料を提供する。

## 明 細 書

### 治療剤

#### 技術分野

本発明は、植物由来の成長因子産生増強物質を含有する成長因子産生増強用組成物、該組成物を含有する、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療剤または予防剤、成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料に関する。また、本発明は、健康増強に優れた機能性食品、飲料又は飼料に関する。

#### 背景技術

セリ科に属する植物、例えばアシタバのもつ薬理作用としては高血圧予防効果、抗菌作用、抗潰瘍作用、胃酸分泌抑制作用、抗癌効果、癌予防効果等が知られている。

キク科に属する植物、例えばベニバナのもつ薬理作用としては抗炎症活性、抗浮腫効果、抗菌活性等が知られている。

ユリ科に属する植物、例えばタマネギのもつ薬理作用としてはコレステロール低下作用、抗菌作用、抗真菌作用、血糖降下作用、抗ぜん息作用、抗炎症作用、アルドースレダクターゼ阻害作用等が知られている。

イチョウ科に属する植物、例えばイチョウのもつ薬理作用としては脳の血液循環促進作用、あざの消失効果、血小板凝集抑制作用、血清コレステロール低下作用等が知られている。

イネ科に属する植物、例えばタケのもつ薬理作用としては抗菌作用、抗真菌作用、血圧降下作用、抗酸化活性等が知られている。また米ぬかにはコレステロール低下作用が知られている。

バラ科に属する植物、例えばバラのもつ薬理作用としては抗炎症作用、抗アレ

ルギー作用、がん細胞増殖抑制作用、抗菌作用等が知られている。またプラムにはコレステロール低下作用、糖尿病予防作用が知られている。

クワ科に属する植物、例えばホップのもつ薬理活性としては抗菌作用、抗腫瘍作用、鎮静作用等が知られている。

ショウガ科に属する植物、例えばガジュツ（紫ウコン）のもつ薬理活性としては抗菌作用、胆汁分泌作用、抗潰瘍活性、抗腫瘍活性等が知られている。

マメ科に属する植物、例えば大豆のもつ薬理作用としてはコレステロール低下作用、抗酸化作用等が知られている。

シナノキ科に属する植物、例えばモロヘイヤのもつ薬理作用としては血圧降下作用、免疫賦活作用等が知られている。

アブラナ科に属する植物、例えばブロッコリーのもつ薬理作用としては抗がん作用が知られている。

しかし、これらの植物成分の成長因子産生増強作用、特に肝細胞増殖因子（HGF）産生増強作用、神経成長因子（NGF）産生増強作用については知られていない。

ところで、部分肝切除を受けた肝臓は、速やかに再生し、もとのサイズになる。この肝再生因子の本体は、長年不明であったが、劇症肝炎患者の血漿中に肝細胞増殖因子（Hepatocyte growth factor : HGF）が見出され、その患者血漿から、単離、精製された（Gohda, E. et al. : J. Clin. Invest., 88 414-419, 1988）。さらに、ヒトHGFのcDNAもクローニングされ、HGFの1次構造も明らかにされた（Miyakawa, K. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 163 967-973, 1989）。また、細胞の運動性を亢進させるscatter factor (SF) および、腫瘍細胞障害因子であるtumor cytotoxic factor (TCF) とHGFが同一物質であることも明らかになった（Weidner, K. M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 7001-7005, 1991, Shima, N. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 180 1151-1158, 1991）。

HGFは肝細胞だけでなく胆管上皮細胞、腎尿細管上皮細胞、胃粘膜細胞など多くの上皮細胞の増殖を促進させる。また、上皮細胞の運動性の亢進や血管新生、上皮細胞の管腔形成で見られるような形態形成を誘導し、HGFは極めて多彩な生理活性を示す多機能活性物質である。つまり、様々な臓器において、その臓器の障害を修復する際の上皮細胞の増殖を促進、運動性の亢進や血管新生などの形態形成の誘導等を行う。

HGFは肝細胞増殖作用、タンパク質合成促進作用、胆汁うっ滞改善作用、さらには薬剤による腎障害の予防作用などを示す。HGFのmRNAは脳、腎臓、肺等でも合成されている。HGFは、胆管上皮細胞、腎尿細管上皮細胞、胃粘膜細胞など多くの上皮細胞の増殖を促進させる中胚葉性細胞成長因子であり、障害を修復する際の上皮細胞の増殖促進や、運動性の亢進、血管新生などの形態形成の誘導など極めて多彩な生理活性を示す多機能活性物質である。さらに、HGFは神経細胞の保護、増殖促進、障害修復作用なども持ち合わせている。従って、HGFの産生を誘導することにより、肝炎、重症肝炎、劇症肝炎、肝硬変、肝内胆汁うっ滞等の肝障害、薬剤等による腎障害、胃腸障害、血管障害、慢性腎炎、肺炎、創傷、糖尿病、がん等の治療又は予防を行うことができると期待されている。

HGFは前記各種作用を示すことから、HGF自身が、肝炎、重症肝炎、劇症肝炎、肝硬変、肝内胆汁うっ滞等の肝障害、薬剤等による腎障害、胃腸障害、血管障害、慢性腎炎、肺炎、創傷、糖尿病、がん等の治療薬として期待されているが、HGFそのものを治療薬として実用化するには至っていない。さらに、遺伝子治療でHGFの遺伝子を導入する方法も試みられているが、不必要な時期、場所で作用することによる副作用により、これも実用化には遠い。このように、HGFを外から投与するのではなく、任意に増強できるのであれば、HGF産生増強を必要とする疾患の治療及び予防に有効であると考えられているが、未だ実用化には至っていない。

ヒトの知的機能、記憶、感情、行動などの精神活動の維持には神経細胞が主要な役割を担っている。これら精神活動の基になっている神経細胞の分化、生存、機能発現には、それぞれの神経細胞に特異的な神経栄養因子が必要であると考えられている。神経栄養因子のうち最初にその存在および機能が明らかにされたのが神経成長因子 (Nerve Growth Factor、以下NGFと略する) であり、現在では脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic Factor)、ニューロトロフィン (Neurotrophin) - 3、ニューロトロフィン-4/5などが見出されている。

NGFは前脳基底部の大細胞性コリン作動性神経細胞の神経栄養因子であることから、アルツハイマー型痴呆症との関連が注目されている〔ファルマシア、Vol. 22、No. 2、147~151 (1986)、老年精神医学、Vol. 3、No. 6、751~758 (1986)〕。アルツハイマー型痴呆症とは発育障害、巣症状、下肢の強直拘攣、てんかん様発作などの臨床を伴い、老人性ブランク、アルツハイマー原線維変化などの病理学的所見を見る疾患であり、老人性痴呆の一病型である。近年の高齢化社会で増加の傾向が見られ、重大な社会的関心が払われているが、これといった症状の改善法、治療法が見つかっていない。

アルツハイマー型痴呆症患者脳には、マイネルト基底核を中心とする前脳基底部に顕著な変性、コリンアセチル基転位酵素 (CAT) 活性の著しい低下が認められている〔Annu. Rev. Neurosci., Vol. 3, 77 (1980)〕。1985年にラット脳を用いた研究で、NGFが脳のこの部位での神経栄養因子であることが明らかにされ〔EMBOJ., Vol. 4, 1389 (1985)〕、NGFと本疾患との関連が注目された。またハンチントン舞踏疾患患者の脳の線条体では、GABA作動性神経細胞の脱落と共にコリン作動性神経細胞の脱落が著しく、NGFが線条体の内在性コリン作動性神経細胞にも作用することが明らかにされ〔Science, Vol. 234, 1341 (1986)〕。

))、本疾患がNGFと関連している可能性が指摘されている。各種の神経疾患のモデルとなり得るラットなどの動物でNGFの効果が研究され、ラットでは神経細胞の変性が顕著になる以前にNGFを脳内投与すれば、変性を食い止めることができ、CAT活性の低下も防げることが報告されている〔J. Neurosci., Vol. 6, 2155 (1986)、Brain Res., Vol. 293, 305 (1985)、Science, Vol. 235, 214 (1986)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, 9231 (1986)〕。末梢の交感神経支配組織および脳でNGFが生合成されていること、このNGFの生合成に末梢組織あるいは脳組織の間質細胞である線維芽細胞あるいはアストログリア細胞が各々重要な役割を担っていることも証明されている〔J. Biol. Chem., Vol. 259, 1259 (1984)、Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 136, 57 (1986)〕。また、この線維芽細胞やアストログリア細胞の産生するNGFの抗原性、分子量、等電点、生物活性は、従来よく研究されていた顎下腺NGFと同一であることが明らかにされるとともに、線維芽細胞(L-M細胞)およびアストログリア細胞の培養液に種々の神経伝達物質を加える実験によって、カテコールアミン類(ノルエピネフリン、エピネフリン、ドーパミン)がNGF産生増強作用を示すことが見出されている〔J. Biol. Chem., Vol. 261, 6039 (1986)〕。

NGFは、NGFが神経栄養因子として作用する部位が変性する神経疾患において、変性を食い止める治療薬として用いることができるのではないかと期待される。また、脳血管障害、脳腫瘍、脳炎、頭部外傷変性疾患、麻酔薬物中毒など脳神経細胞が一旦変性に陥れば、生涯回復することがなく、その結果、知的機能低下、記憶障害のみならず、感情障害、行動異常など様々な障害を引き起こすが、神経線維には可塑性があり、損傷を受けると、その付近の健常な線維から発芽が起こり、障害されたシナプスに変わって新しいシナプスが形成されるので、こ

の時NGFが神経機能の修復再生を促す治療剤として用いることができるのではないかと期待される。

しかしながら、NGFを各種神経疾患の治療に応用しようとした場合、NGFはNGFを必要とする神経細胞の極く近傍に達していなければならないし、中枢神経疾患の場合も脳細胞の患部にNGFを送り届けなければならないが、血管系を通してNGFを脳内に送り込むことはできない。なぜならば、脳内の血管内皮細胞は、互いに密着結合で結合しており（脳血液関門という）、水、ガス、脂溶性物質以外の物質の血液から脳組織への移行は制限を受けているからであり、高分子物質であるタンパク質（NGFも含む）はまったく脳血管関門を通ることが出来ないからである。このNGFを直接脳内に外科的手法を用いて投入することは、現在の技術をもってしても危険が大き過ぎる。

一方、直接、NGFを投与するのではなく、NGFの産生を増強する物質の開発も行われているが、その多くは、強い毒性を有するか、毒性が出る濃度と有効な濃度が非常に接近した物質、または神経興奮作用など神経系に対して重大な副作用を生じる物質であるなど、多くの問題点を抱えており、いまだ実用化には至っていない。

このように、成長因子を増強することで当該成長因子に関連する種々の疾患の治療または予防が可能になると考えられるが、毒性や副作用を示さず、所望により適切に成長因子の産生増強を行い得る物質、手段等は未だ知られていない。

## 発明の開示

本発明は、植物、例えばセリ科、キク科、ユリ科、イチヨウ科、イネ科、バラ科、クワ科、マメ科、シナノキ科、アブラナ科またはショウガ科に属する植物の果実、種子、種皮、花、葉、茎、根及び／又は根茎由来の成長因子産生増強物質を有効成分として含有する成長因子産生増強用組成物、及び成長因子産生増強物質の生理作用を利用した医薬、食品、飲料又は飼料を提供することを目的とする。

ものである。

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、植物由来の成長因子産生増強物質を有効成分として含有することを特徴とする成長因子産生増強用組成物に関する。本発明の第1の発明において、植物としては、セリ科、キク科、ユリ科、イチョウ科、イネ科、バラ科、クワ科、マメ科、シナノキ科、アブラナ科及びショウガ科に属する植物からなる群より選択される1以上の植物が好適である。また、植物由来の成長因子産生増強物質としては、クロロゲン酸(chlorogenic acid)、ジカフェオイルキナ酸(dicaffeoyl-quinic acid)、カフェオイルキナ酸(caffeoyl-quinic acid)、イソオリエンチン(isoorientin)、サフロミンA(safflorin A)、グアイアナライド(guaianolide)、キサントアンゲロール(xanthoangelol)、3'-O- $\beta$ -D-グルコピラノイル ケラクトン(3'-O- $\beta$ -D-glucopyranoyl khellactone)、7-O- $\beta$ -D-グルコピラノシルオキシ-8-プレニルクマリン(7-O- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-8-prenylcoumarin)、コーヒー酸メチルエステル(caffeic acid methyl ester)、コーヒー酸エチルエステル(caffeic acid ethyl ester)、8-カルボキシル-3-ヒドロキシ-5-メトキシル-2-ジメチルクroman(8-carboxyl-3-hydroxy-5-methoxyl-2-dimethylchroman)、7- $\beta$ -D-グルコピラノシルオキシ-6-プレニルクマリン(7- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-6-prenylcoumarin)、4'-O-アンゲロイル-3'-O-[6-O-( $\beta$ -D-グルコピラノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル]-ケラクトン(4'-O-angeloyl-3'-O-[6-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-khellactone)、イソキサントフモール(isoxanthohumol)、キサントフモールB(xanthohumol B)、キサントフモールD(xanthohumol D)及びキサントフモール(xanthohumol)からなる群より選択される1以上の化合物が好適である。さらに、当該組成物としては植物由来の抽出物、もしくは該植物抽出物から得られる画分を含有する組成物も包含される。また、特に好ましくは当該組成物は植物由来の成長因子産生増強物質を高濃度及び／又は高純度に含有することができる。また、成



長因子としては、好適には肝細胞増殖因子または神経成長因子である。

本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明の組成物を含有することを特徴とする、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療剤または予防剤に関する。

本発明の第3の発明は、本発明の第1の発明の成長因子増強用組成物を含有することを特徴とする成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料に関する。

本発明の第4の発明は、植物由来の成長因子産生増強物質を高濃度及び／又は高純度に含有することを特徴とする食品、飲料又は飼料に関する。

植物由来の成長因子産生増強物質としては、クロロゲン酸、ジカフェオイルキナ酸、カフェオイルキナ酸、イソオリエンチン、サフロミンA、グアイアナノライド、キサントアンゲロール、3'-O-β-D-グルコピラノイル ケラクトン、7-O-β-D-グルコピラノシルオキシ-8-プレニルクマリン、コーヒー酸メチルエステル、コーヒー酸エチルエステル、8-カルボキシル-3-ヒドロキシ-5-メトキシル-2-ジメチルクロマン、7-β-D-グルコピラノシルオキシ-6-プレニルクマリン、4'-O-アンゲロイル-3'-O-[6-O-(β-D-グルコピラノシル)-β-D-グルコピラノシル]-ケラクトン、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールDおよびキサントフモールからなる群より選択される1以上の化合物が好適である。

本発明の第5の発明は、本発明の第1の発明の組成物を高濃度及び／又は高純度に含有することを特徴とする食品、飲料又は飼料に関する。

植物由来の成長因子産生増強用組成物としては、クロロゲン酸、ジカフェオイルキナ酸、カフェオイルキナ酸、イソオリエンチン、サフロミンA、グアイアナノライド、キサントアンゲロール、3'-O-β-D-グルコピラノイル ケラクトン、7-O-β-D-グルコピラノシルオキシ-8-プレニルクマリン、コーヒー酸メチルエステル、コーヒー酸エチルエステル、8-カルボキシル-3-ヒドロキシ-5-メトキシル-2-ジメチルクロマン、7-β-D-グルコピラノシルオキシ-6-プレニルクマリン、4'-O-アンゲロイル-3'-O-[6-

ーOー (β-D-グルコピラノシル) -β-D-グルコピラノシル] -ケラクトン、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールDおよびキサントフモールからなる群より選択される1以上の化合物を含有する組成物が好適である。

本発明の第6の発明は、キサントフモールを0.00007重量%以上含む神経成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料に関する。

本発明の第7の発明は、成長因子産生増強物質を含有する食品、飲料、飼料又はそれらの処理物を含有する成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料に関する。その態様としては、ビール類を含有する成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料が好適であり、ビール類には、ビール、発泡酒、ノンアルコールビール飲料、これらの濃縮物、これらの希釈物、ホップ抽出物含有飲料が包含される。

本発明の第8の発明は、ホップ抽出物を含有する成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料に関する。ホップ抽出物は食品、飲料又は飼料中、0.0001重量%以上含有されるのが好適である。

本発明の第9～11の発明は、それぞれグアイアノライドを有効成分として含有することを特徴とする成長因子産生増強用組成物、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療剤または予防剤、または成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料に関する。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、化合物(1)の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す図(上)およびクロロゲン酸標品の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す図(下)である。

第2図は、アシタバ由来の抽出画分1～3に含まれるクロロゲン酸濃度と各画分のHGF産生増強活性の相関関係を示す図である。

第3図は、クロロゲン酸標品濃度とHGF産生増強活性の相関関係を示す図である。

第4図は、化合物(2)の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第5図は、国産菊花クロロホルム抽出画分A-a-2のMSスペクトルを示す図である。

第6図は、国産菊花クロロホルム抽出画分A-a-2の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第7図は、国産菊花クロロホルム抽出画分A-b-1のMSスペクトルを示す図である。

第8図は、国産菊花クロロホルム抽出画分A-b-1のIRスペクトルを示す図である。

第9図は、国産菊花クロロホルム抽出画分A-b-1の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第10図は、国産菊花クロロホルム抽出画分A-b-1の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第11図は、アシタバ抽出画分の7.82分のピークを含むフラクションの質量スペクトルを示す図である。

第12図は、アシタバ抽出画分の7.82分のピークを含むフラクションのIRスペクトルを示す図である。

第13図は、アシタバ抽出画分の7.82分のピークを含むフラクションの $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第14図は、アシタバ抽出画分の7.82分のピークを含むフラクションの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第15図は、アシタバ抽出画分の11.09分のピークを含むフラクションの質量スペクトルを示す図である。

第16図は、アシタバ抽出画分の11.09分のピークを含むフラクションのIRスペクトルを示す図である。

第17図は、アシタバ抽出画分の11.09分のピークを含むフラクションの $^1\text{H}$ -

-NMRスペクトルを示す図である。

第18図は、アシタバ抽出画分の11.09分のピークを含むフラクションの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第19図は、アシタバ根部由来フラクション10のFAB-MSスペクトルを示す図である。

第20図は、アシタバ根部由来フラクション10の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第21図は、アシタバ根部由来フラクション13-2のFAB-MSスペクトルを示す図である。

第22図は、アシタバ根部由来フラクション13-2の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第23図は、アシタバ根部由来フラクション13-2の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第24図は、アシタバ根部由来フラクション18-3のFAB-MSスペクトルを示す図である。

第25図は、アシタバ根部由来フラクション18-3の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第26図は、アシタバ根部由来フラクション18-4のFAB-MSスペクトルを示す図である。

第27図は、アシタバ根部由来フラクション18-4の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第28図は、アシタバ根部由来フラクション18-4の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第29図は、アシタバ根部由来フラクション19、20-5のFAB-MSスペクトルを示す図である。

第30図は、アシタバ根部由来フラクション19、20-5の $^1\text{H}$ -NMR

スペクトルを示す図である。

第 3 1 図は、アシタバ根部由来フラクション 1 9、2 0 - 5 の  $^{13}\text{C}$  - NMR スペクトルを示す図である。

第 3 2 図は、アシタバ根部由来フラクション 1 9、2 0 - 6 の FAB - MS スペクトルを示す図である。

第 3 3 図は、アシタバ根部由来フラクション 1 9、2 0 - 6 の  $^1\text{H}$  - NMR スペクトルを示す図である。

第 3 4 図は、アシタバ根部由来フラクション 1 9、2 0 - 6 の  $^{13}\text{C}$  - NMR スペクトルを示す図である。

第 3 5 図は、アシタバ根部由来フラクション 2 8 の FAB - MS スペクトルを示す図である。

第 3 6 図は、アシタバ根部由来フラクション 2 8 の  $^1\text{H}$  - NMR スペクトルを示す図である。

第 3 7 図は、キサントフモールフラクション由来のフラクション A - 5 の FAB - MS スペクトルを示す図である。

第 3 8 図は、キサントフモールフラクション由来のフラクション A - 5 の  $^1\text{H}$  - NMR スペクトルを示す図である。

第 3 9 図は、ホップ由来キサントフモールフラクションの  $^1\text{H}$  - NMR スペクトルを示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明において、植物由来の成長因子産生増強物質を有効成分として含有することを特徴とする成長因子産生増強用組成物が提供される。植物における成長因子産生増強作用を示す物質の存在は、本発明において初めて見出されたものである。なお、本明細書において、有効成分として挙げるいずれの物質も単独でもしくは 2 種以上混合して本発明において用いることができる。

本発明に係る植物由来の成長因子産生増強物質としては、後述する当該物質の調製方法により得られ得るものであれば特に限定されるものではない。中でも、セリ科、キク科、ユリ科、イチヨウ科、イネ科、バラ科、クワ科、マメ科、シナノキ科、アブラナ科及びショウガ科に属する植物からなる群より選択される1以上の植物に由来する成長因子産生増強作用を有する物質が好適である。

セリ科に属する植物としては、例えばアシタバ、シシウド、ニンジン、セリ、ミツバ、セロリ等が例示される。キク科に属する植物としては、例えばキク、タンポポ、ヒマワリ、アザミ、春菊、食用の菊花、ゴボウ、フキ、ヨモギ等が例示され、例えばヨモギとしてはサザバルヨモギが好適に使用される。ユリ科に属する植物としては、例えばタマネギ、ネギ、ニンニク、チューリップ、ユリ等が例示される。イチヨウ科に属する植物としてはイチヨウが例示される。イネ科に属する植物としては、例えばモウソウチク、マダケ、ハチク、ホウライチク、ササ、イネ、ムギ、ヨシ、シバ、キビ等が例示され、穀物やその処理物、例えば米ぬか、ふすま等も使用することができる。バラ科に属する植物としては、例えばヤマザクラ、ソメイヨシノ、ウメ、モモ、プラム、アーモンド、リンゴ、バラ、キイチゴ、ビワ、ハマナス、ベンケイソウ等が例示される。クワ科に属する植物としては、例えばクワ、イチジク、ホップ、コウゾ、ハリグワ、パンノキ、ゴムノキ等が例示される。ショウガ科に属する植物としては、例えばショウガ、ウコン、ミョウガ、ハナショウガ等が例示され、ウコンとしては、特に好適にはガジュツ（紫ウコン）が例示される。シナノキ科に属する植物としては例えばモロヘイヤが例示される。マメ科に属する植物としては、例えば大豆、アズキ、インゲン豆、リョクトウ等が例示される。アブラナ科に属する植物としては、キャベツ、ブロッコリー、カリフラワー、白菜、菜の花等が例示される。

また、本発明に使用される植物は、特に限定はないが、果実、種子、種皮、花、葉、莖、根及び／又は根莖、それらの処理物、例えば米ぬか、ふすま、大豆胚芽、大豆種皮、ソヤミール等もしくは植物体そのままを、表皮を剥いて表皮のみ

、表皮を除去したそれ以外の部分、もしくはそのままを使用することができる。

また、本発明において植物由来の成長因子産生増強物質としては、成長因子を増強する活性を有する植物由来の物質であれば特に限定はなく、本発明の所望の効果の発現の観点から、好ましくはクロロゲン酸、ジカフェオイルキナ酸、カフェオイルキナ酸、イソオリエンチン、サフロミンA、グアイアナライド、キサントアンゲロール、3'-O-β-D-グルコピラノイル ケラクトン、7-O-β-D-グルコピラノシルオキシ-8-プレニルクマリン、コーヒー酸メチルエステル、コーヒー酸エチルエステル、8-カルボキシル-3-ヒドロキシ-5-メトキシル-2-ジメチルクロマン、7-β-D-グルコピラノシルオキシ-6-プレニルクマリン、4'-O-アングロイル-3'-O-[6-O-(β-D-グルコピラノシル)-β-D-グルコピラノシル]-ケラクトン、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールD及びキサントフモールからなる群より選択される1以上の化合物が例示される。また、本発明で使用する有効成分としての物質の成長因子産生増強作用の発現は、たとえば、本発明に開示の方法（たとえば、実施例4-(1)および実施例13に記載の方法）により評価することができる。当該物質は、植物由来の成長因子産生増強作用を示す物質であれば限定はなく、前記例示する有効成分として好適な化合物以外のものも当然包含される。本発明においてカフェオイルキナ酸としては、好適には5-カフェオイルキナ酸 (5-caffeoyl-quinic acid)、4-カフェオイルキナ酸 (4-caffeoyl-quinic acid) が例示される。また、本発明においてグアイアナライドとしては、好適には2-オキソ-8-アングロイルオキシ-グアイア-3(4), 11(13)-ジエン-12, 6-オリド (2-Oxo-8-angeloyloxy-guaia-3(4), 11(13)-dien-12, 6-olide) または3, 4-エポキシ-8-アングロイルオキシ-グアイア-1(10), 11(13)-ジエン-12, 6-オリド (3, 4-Epoxy-8-angeloyloxy-guaia-1(10), 11(13)-dien-12, 6-olide) が例示される。なお本発明において、植物由来とは植物原料より得られることを意味する。

また、本発明の成長因子産生増強用組成物は、その一態様として、成長因子産生増強物質を含む、植物由来の抽出物もしくは該植物抽出物から得られる画分を含む組成物が例示される。当該組成物は、前記抽出物もしくは画分そのものであってもよい。植物からの抽出精製は、次のような公知の方法で行うことができる。例えば原料である植物の果実、種子、種皮、花、葉、茎、根及び／又は根茎等を、適当な時期に採取した後に、そのままか、通常空気乾燥等の乾燥工程を行った後、所望により粉碎し、抽出原料とする。また種々の条件で原料の熟成を行い、熟成後の原料を使用しても良い。また植物の処理物、例えば米ぬか、ふすま、大豆胚芽、大豆種皮、ソヤミール等を使用してもよい。原料が植物の搾汁液や樹液の場合はそのまま抽出原料として用いることもできる。なお、本発明において植物由来の抽出物とは、植物から抽出溶媒を用いて抽出操作を行う工程を経て得られる物質のことをいう。

植物体からの成長因子産生増強物質の調製は、公知の抽出方法により以下のように行うことができる。例えば原料を粉碎もしくは細切した後、溶媒を用いてバッチ式もしくは連続式で行うことができる。抽出溶媒としては、水、クロロホルム、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、酢酸メチル、酢酸エチル等の親水性もしくは親油性の溶媒を挙げることができ、所望により単独で、もしくは適宜混合液として用いることができる。通常、好適には水やエタノール含有水、エタノールを使用することにより行うことができる。抽出溶媒の量は適宜決定すればよいが、通常、原料に対し、好ましくは1～100倍量の抽出溶媒を使用すればよい。抽出温度も適宜、目的に応じて決定すればよいが、水抽出の場合は通常、好ましくは4～130℃、より好ましくは25～100℃である。また、溶媒中にエタノールが含まれる場合は4～60℃の範囲が好適である。抽出時間も、抽出効率を考慮し決定すればよいが、通常、好ましくは数分～数日、より好ましくは5分～3時間の範囲となるように、原料、抽出溶媒、抽出温度を設定するのが好適



である。抽出操作は、たとえば、攪拌しながら又は静置して行えばよく、また、必要に応じて数回繰り返してもよい。以上の操作により、成長因子産生増強物質は、当該物質を含む抽出物として得られる。抽出物は必要に応じ、ろ過、遠心分離、濃縮、限外ろ過、分子ふるい等の処理を行い、目的の成長因子産生増強物質が濃縮された抽出物を調製することができる。抽出物や濃縮抽出物の成長因子産生増強活性は、後述の実施例 4 - (1) や実施例 13 記載の方法により簡便に測定することができる。

また、本発明において、植物抽出物から得られる画分とは、植物由来の抽出物を公知の方法で分画することによって得られる画分や、分画操作を複数回繰り返すことにより得られる単一の物質を含有する画分のことをいい、成長因子産生増強作用を有していれば本発明に包含される。上記の分画手段としては、抽出、分別沈殿、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等が挙げられる。得られた画分の精製を、成長因子産生増強活性を指標として、さらに進めることにより、成長因子産生増強物質を単離することもできる。

また、植物を公知の方法で茶葉状にし、これを用いた抽出物または該植物抽出物から得られる画分も、成長因子産生増強作用を有していれば、本発明の抽出物または該植物抽出物から得られる画分として使用することができる。また、これらの抽出物または該植物抽出物から得られる画分を 2 種以上含有して使用することもできる。なお、本発明では同じ植物から異なった抽出法で得られた抽出物または該植物抽出物から得られる画分を 2 種以上含有して使用することもできる。

また、植物由来の抽出物および該植物抽出物から得られる画分以外の成長因子産生増強用組成物の製造方法としては、例えば植物を乾燥させ、粉碎することで粉状の当該組成物を得ることができる。

なお、本発明における植物由来の成長因子産生増強用組成物は、植物体そのものと比較して成長因子産生増強物質を高濃度及び／又は高純度に含有するものが特に好ましい。ここで高濃度とは、原料である植物体の単位重量あたりの成長因

子産生増強物質重量よりも組成物の単位重量あたりの成長因子産生増強物質重量の方が多いことを意味する。また、高純度とは、原料である植物と比較して当該組成物の成長因子産生増強物質の含有率が高いことを意味する。

また、本発明は成長因子産生増強物質を高濃度及び／又は高純度に含有する食品、飲料又は飼料を提供するが、これは従来の食品、飲料又は飼料と比べて、本発明の食品、飲料又は飼料中には成長因子産生増強物質が高濃度及び／又は高純度に含有されていることを意味する。

なお、当該組成物を有効成分として含有する成長因子産生増強剤も本発明に含まれる。

本発明において、植物由来の成長因子産生増強用組成物の形状としては、植物由来の成長因子産生増強物質が含有されていれば特に限定はないが、粉状、固形状、液状のいずれの形状であってもよい。また、当該組成物を公知の方法で造粒して粒状の固形物として、本発明の成長因子産生増強用組成物として使用することができる。造粒方法としては、特に限定はないが、転動造粒、攪拌造粒、流動層造粒、気流造粒、押出し造粒、圧縮成型造粒、解砕造粒、噴射造粒又は噴霧造粒等が例示される。粉状の当該組成物を液体、例えば水やアルコール等に溶解して液状とし、本発明の成長因子産生増強用組成物として使用することもできる。

本発明に係る有効成分には、後述するように特に毒性は認められない。また、副作用の発生の心配もない。それゆえ、安全かつ適切に成長因子の産生増強を行うことができる。従って、当該有効成分を含んでなる本発明の治療剤、予防剤、食品、飲料または飼料は、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療または予防に有効である。

本発明において成長因子とは細胞の成長を促進する活性を有していれば特に限定はないが、肝細胞増殖因子（HGF）、神経成長因子（NGF）、神経栄養因子、上皮成長因子、ミルク由来成長因子、線維芽細胞成長因子、脳由来線維芽細胞成長因子、酸性線維芽細胞成長因子、血小板由来成長因子、血小板塩基性タ

ンパク、結合組織活性化ペプチド、インスリン様増殖因子、コロニー形成刺激因子、エリスロポエチン、スロンボポエチン、T細胞成長因子、インターロイキン類（例えばインターロイキン2、3、4、5、7、9、11、15）、B細胞成長因子、軟骨由来因子、軟骨由来成長因子、骨由来成長因子、骨格成長因子、内皮細胞成長因子、内皮細胞由来成長因子、眼由来成長因子、精巢由来成長因子、セルトリ細胞由来成長因子、乳腺刺激因子、脊髄由来成長因子、マクロファージ由来成長因子、リサイクル間葉成長因子、形質転換増殖因子- $\alpha$ 、形質転換増殖因子- $\beta$ 、ヘパリン結合性EGF様増殖因子、アンフィレグリン、SDGF、ベーターセルリン、エピレグリン、ニューレグリン1、2、3、血管内皮増殖因子、ニューロトロフィン、BDNF、NT-3、NT-4、NT-5、NT-6、NT-7、グリア細胞株由来神経栄養性因子、幹細胞因子、ミッドカイン、プレイオトロフィン、Ephrin、Angiopoietin、アクチビン、腫瘍壊死因子、インターフェロン類等が例示される。本発明によれば、特に神経成長因子（NGF）または肝細胞増殖因子（HGF）を好適に産生増強することができる。

HGFは肝細胞の再生因子であり、さらに細胞の運動を亢進させる因子、および腫瘍細胞障害因子でもある。HGFは肝細胞だけでなく胆管上皮細胞、腎尿細管上皮細胞、胃粘膜細胞等、多くの上皮細胞の増殖を促進させる。また、HGFは、上皮細胞の運動性亢進や血管新生、上皮細胞の管腔形成で見られるような形態形成を誘導する等、極めて多彩な生理活性を示す。従って、HGFの産生を増強することにより、たとえば、肝炎、重症肝炎、劇症肝炎、肝硬変、肝内胆汁うっ滞等の肝障害、薬剤等による腎障害、胃腸障害、血管障害、慢性腎炎、肺炎、創傷、糖尿病、がん等の治療または予防を行うことができる。

一方、NGFは神経細胞の生存や機能を維持したり、NGFの濃度勾配に従って神経細胞を伸長させたりする内因性の成長因子であり、NGFの産生を増強することにより、アルツハイマー病等の老人痴呆症や末梢神経障害、脳血管障害、

脳腫瘍、脳炎、頭部外傷変性疾患、麻酔薬物中毒等による神経機能の修復・再生を要する疾患の治療または予防を行うことができる。また、筋萎縮性側索硬化症、薬剤障害性末梢神経障害、糖尿病性末梢神経障害、パーキンソン病、感覚神経障害、色素性網膜症、黄斑変性症等の治療または予防にも有用である。

本発明における成長因子産生増強を必要とする疾患としては、本発明の治療剤、予防剤等を投与することにより治療または予防されるものであれば特に限定はないが、肝炎、重症肝炎、劇症肝炎、肝硬変、肝内胆汁うっ滞等の肝障害、薬剤等による腎障害、胃腸障害、血管障害、慢性腎炎、肺炎、創傷、糖尿病、がん、痴呆症、神経障害、末梢神経病、脳虚血、糖尿病性ニューロパシー等が例示される。

本発明で使用する植物由来の成長因子産生増強用組成物を含有することを特徴とする、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療剤または予防剤は、植物由来の成長因子産生増強用組成物を用いて適宜製造することができる。

本発明の治療剤又は予防剤は、本発明で使用する植物由来の成長因子産生増強用組成物と公知の医薬用担体とを組合せ製剤化すれば良い。また、成長因子産生増強物質と公知の医薬用担体とを組合せて製剤化することにより製造することもできる。

当該製剤の製造は、一般的には本発明で使用する植物由来の成長因子産生増強用組成物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、所望により溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。また、使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品や、その他、外用剤とすることもできる。

医薬用担体は、治療剤または予防剤の投与形態及び剤型に応じて選択することができる。経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の

調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い、本発明の有効成分である植物由来の成長因子産生増強用組成物を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製することができる。

本発明の治療剤または予防剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

本発明の治療剤または予防剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明で使用する植物由来の成長因子産生増強用組成物の量として、成人1日当り好ましくは0.001～2000 mg/kg体重であり、より好ましくは0.01～200 mg/kg体重である。また、当該製剤中に含有される植物由来の成長因子産生増強物質の量として、成人1日当り好ましくは0.0001～2000 mg/kg体重であり、より好ましくは0.001～200 mg/kg体重であり、更に好ましくは0.01～20 mg/kg体重である。

もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。また本発明で使用する植物由来の成長因子産生増強用組成物を成長因子産生増強用の飲食品の原料として用いても良い。

また、本発明の別の態様として、本発明に係る有効成分としての成長因子産生増強物質を含む成長因子産生増強剤を提供することもできる。当該増強剤としては、前記有効成分そのものであってもよく、また、前記有効成分を含む組成物であってもよい。成長因子産生増強剤は、たとえば、前記有効成分を当該有効成分と同じ用途に使用可能な他の成分などと配合し、上記治療剤または予防剤の製造方法に準じて通常使用される試薬の形態に製造すればよい。かかる増強剤における前記有効成分の含有量は、当該増強剤の投与方法、使用目的などを考慮し、本発明の所望の効果の発現が得られ得るような量であればよく、特に限定されるものではない。また、該増強剤の使用量も、本発明の所望の効果の発現が得られ得るようであれば特に限定されるものではない。特に、生体に投与して使用する場合には、好ましくは前記治療剤または予防剤における有効成分の投与量範囲内で有効成分を投与できる量で使用すればよい。成長因子産生増強剤は、成長因子産生増強、特にHGFまたはNGF産生増強を必要とする疾患における当該成長因子の増強に有用である。また、該増強剤は、成長因子の機能研究、成長因子に関連する疾患用医薬のスクリーニングにも有用である。

さらに、本発明の別の態様として、本発明に係る前記有効成分を動物に投与する成長因子産生の増強方法を提供することもできる。かかる方法は、成長因子産生の増強が必要であると予想される、または、その必要のある動物に対し、前記有効成分を、好ましくは、前記成長因子産生増強剤として投与することにより行うことができ、かかる投与により、成長因子の産生を増強せしめる。有効成分の投与方法、投与量などは、前記成長因子産生増強剤の場合と同様とすればよい。なお、成長因子産生の増強方法では、本発明の治療剤または予防剤、後述の食品、飲料または飼料を用いることもできる。また、「動物」としては、たとえば、哺乳動物であるヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ウマ等を挙げることができ、中でも、ヒトに対し好適に用いられる。かかる成長因子産生の増強方法は、たとえば、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療または予防における成長因子産生

増強に有用である。また、該増強方法は、成長因子の機能研究、成長因子に関連する疾患用医薬のスクリーニングにも有用である。

次に本発明で使用される植物由来の成長因子産生増強用組成物、または植物由来の成長因子産生増強物質を含有してなる食品、飲料又は飼料は、その成長因子産生増強作用により、本発明で使用する植物由来の成長因子産生増強用組成物等に感受性を示す成長因子産生増強を要する疾患の症状改善、予防に、もしくは後述のように生物の体調改善に極めて有用である。

なお、本発明の態様において、「含有」の語は、含有、添加、希釈の意を含むものであり、「含有」とは食品、飲料または飼料中に本発明で使用される有効成分が含まれるという態様を、「添加」とは食品、飲料または飼料の原料に、本発明で使用される有効成分を添加するという態様を、「希釈」とは本発明で使用される有効成分に、食品、飲料または飼料の原料を添加するという態様をいうものである。

本発明の食品又は飲料の製造法は、特に限定はない。たとえば、配合、調理、加工等は一般の食品、飲料に用いられているものに従えばよく、かかる食品、飲料の製造法により製造することができ、製造された食品又は飲料に成長因子産生増強作用を有する、植物由来の成長因子産生増強用組成物、又は植物由来の成長因子産生増強物質が含有されていれば良い。また、食品または飲料中に植物を混合して加熱、放置等を行い、必要に応じて植物の抽出残渣を除去して得られる成長因子産生増強用食品又は飲料も本発明に包含される。また、成長因子産生増強物質を含有する食品、飲料又はその処理物を含有する成長因子産生増強作用を有する食品又は飲料も本発明の食品又は飲料である。なお、処理物とは、例えば、成長因子産生増強作用を有する飲料の濃縮及び希釈等を挙げることができる。

その態様としては、ビール類を含有する成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料が好適であり、ビール類には、ビール、発泡酒、ノンアルコールビール飲料、これらの濃縮物、これらの希釈物、ホップ抽出物含有飲料が包含される。

本発明の食品又は飲料とは、特に限定はないが、例えば穀物加工品（小麦粉加工品、デンプン類加工品、プレミックス加工品、麺類、マカロニ類、パン類、あん類、そば類、麴、ビーフン、はるさめ、包装餅等）、油脂加工品（可塑性油脂、てんぷら油、サラダ油、マヨネーズ類、ドレッシング等）、大豆加工品（豆腐類、味噌、納豆等）、食肉加工品（ハム、ベーコン、プレスハム、ソーセージ等）、水産製品（冷凍すりみ、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつま揚げ、つみれ、すじ、魚肉ハム、ソーセージ、かつお節、魚卵加工品、水産缶詰、つくだ煮等）、乳製品（原料乳、クリーム、ヨーグルト、バター、チーズ、練乳、粉乳、アイスクリーム等）、野菜・果実加工品（ペースト類、ジャム類、漬け物類、果実飲料、野菜飲料、ミックス飲料等）、菓子類（チョコレート、ビスケット類、菓子パン類、ケーキ、餅菓子、米菓類、ウイスキーボンボン等）、アルコール飲料（日本酒、中国酒、ワイン、ウイスキー、焼酎、ウオッカ、ブランデー、ジン、ラム酒、ビール、清涼アルコール飲料、果実酒、リキュール等）、嗜好飲料（緑茶、紅茶、ウーロン茶、コーヒー、清涼飲料、乳酸飲料等）、調味料（しょうゆ、ソース、酢、みりん等）、缶詰・瓶詰め・袋詰め食品（牛飯、釜飯、赤飯、カレー、その他の各種調理済み食品）、半乾燥又は濃縮食品（レバーペースト、その他のスプレッド、そば・うどんの汁、濃縮スープ類）、乾燥食品（即席麺類、即席カレー、インスタントコーヒー、粉末ジュース、粉末スープ、即席味噌汁、調理済み食品、調理済み飲料、調理済みスープ等）、冷凍食品（すき焼き、茶碗蒸し、うなぎかば焼き、ハンバーグステーキ、シュウマイ、餃子、各種スティック、フルーツカクテル等）、固形食品、液体食品（スープ等）、香辛料類等の農産・林産加工品、畜産加工品、水産加工品等が挙げられる。

本発明の食品又は飲料中の植物由来の成長因子産生増強作用を有する有効成分の含有量は特に限定されず、その官能と活性発現の観点から適宜選択できるが、例えば食品中、好ましくは0.000001重量%以上、より好ましくは0.00001～1.00重量%、更に好適には0.0003～90重量%であり、例え



ば、飲料中、好ましくは0.000001重量%以上、より好ましくは0.00001~100重量%、更に好適には0.0003~90重量%である。また本発明の食品又は飲料は、好ましくは、それらに含有される有効成分が、例えば成人1日当たり好ましくは0.0001~100mg/kg体重、より好ましくは0.001~10mg/kg体重、更に好ましくは0.01~1mg/kg体重となるように摂取すればよい。

また、本発明により、前記成長因子産生増強用組成物を高濃度及び/又は高純度に含有してなる食品又は飲料が提供される。なお、「前記成長因子産生増強用組成物を高濃度及び/又は高純度に含有してなる」とは、本発明の態様における食品又は飲料に、成長因子産生増強用組成物に由来する成長因子産生増強物質が高濃度及び/又は高純度に含有されている程度に、もしくは成長因子産生増強作用の発現の観点から、成長因子産生増強物質が高濃度及び/又は高純度に含有されているに匹敵する程度に、成長因子産生増強用組成物が含有されていることをいう。

当該食品又は飲料の製造においては、成長因子産生増強用組成物として、たとえば、成長因子産生増強物質が含まれる植物抽出物、例えばセリ科植物抽出物、キク科植物抽出物、ユリ科植物抽出物、イチヨウ科植物抽出物、イネ科植物抽出物、バラ科植物抽出物、クワ科植物抽出物、マメ科植物抽出物、シナノキ科植物抽出物、アブラナ科植物抽出物及びショウガ科植物抽出物から選択される抽出物を使用してもよく、有効成分として、好ましくはクロロゲン酸、ジカフェオイルキナ酸、カフェオイルキナ酸、イソオリエンチン、サフロミンA、グアイアナライド、キサントアンゲノール、3'-O-β-D-グルコピラノイル ケラクトン、7-O-β-D-グルコピラノシルオキシ-8-プレニルクマリン、コーヒー酸メチルエステル、コーヒー酸エチルエステル、8-カルボキシル-3-ヒドロキシ-5-メトキシル-2-ジメチルクロマン、7-β-D-グルコピラノシルオキシ-6-プレニルクマリン、4'-O-アンゲロイル-3'-O-[6-O-

ー ( $\beta$ -D-グルコピラノシル) -  $\beta$ -D-グルコピラノシル] - ケラクトン、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールD及びキサントフモールからなる群より選択される1以上の化合物を含有する組成物、たとえば、植物由来の抽出物を使用してもよい。

本発明は、植物由来の成長因子産生増強物質を高濃度及び／又は高純度に含有する健康増強用食品又は飲料をも提供するものであり、当該食品又は飲料を日常的に摂取することにより、生体内での成長因子の産生が増強され、健康が維持・増強され得る。

すなわち、本発明の態様においては、植物由来の成長因子産生増強物質を高濃度及び／又は高純度に含有してなることを特徴とする食品又は飲料が提供される。

本発明の態様においては、植物由来の成長因子産生増強増強物質としては、クロロゲン酸、ジカフェオイルキナ酸、カフェオイルキナ酸、イソオリエンチン、サフロミンA、グアイアノライド、キサントアングロール 3' - O -  $\beta$ -D-グルコピラノイル ケラクトン、7 - O -  $\beta$ -D-グルコピラノシルオキシ - 8 - プレニルクマリン、コーヒー酸メチルエステル、コーヒー酸エチルエステル、8 - カルボキシル - 3 - ヒドロキシ - 5 - メトキシル - 2 - ジメチルクロマン、7 -  $\beta$ -D-グルコピラノシルオキシ - 6 - プレニルクマリン、4' - O - アングロイル - 3' - O - [ 6 - O - ( $\beta$ -D-グルコピラノシル) -  $\beta$ -D-グルコピラノシル] - ケラクトン、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールDおよびキサントフモールからなる群より選択される1以上の化合物が好適であり、当該化合物を高濃度及び／又は高純度に含有する食品又は飲料が提供される。

たとえば、本発明において、HGF産生増強物質を含む組成物としてタケ抽出物を使用する場合は、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは0.00001重量%以上含有させるのが好適である。タケ抽出物は、例えばタケの葉を温

水中で保持することにより調製することができる。また抽出物中のイソオリエンチン含量を測定し、その有効量を食品又は飲料に含有させてもよい。イソオリエンチンの含有量としては、食品又は飲料中に、好ましくは0.01重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、HGF産生増強物質を含む組成物としてタマネギ抽出物を使用する場合は、例えばタマネギ薄皮の熱水抽出物、例えば5gのタマネギ薄皮を100mlの水中で100℃、15分間加熱処理したものを、食品又は飲料中に乾燥重量換算で好ましくは1重量%以上含有させればよい。

本発明において、HGF産生増強物質を含む組成物としてイチヨウ抽出物を使用する場合は、例えばイチヨウ茶葉の熱水抽出物、例えば3gのイチヨウ茶葉を200mlの水中で100℃、15分間加熱処理したものを、食品又は飲料中に乾燥重量換算で好ましくは5重量%以上含有させればよい。

本発明において、HGF産生増強物質を含む組成物としてイチヨウ抽出物を使用する場合は、例えばイチヨウ茶葉の熱水抽出物、例えば3gのイチヨウ茶葉を200mlの水中で100℃、15分間加熱処理したものを、食品又は飲料中に乾燥重量換算で好ましくは5重量%以上含有させればよい。

本発明において、HGF産生増強物質を含む組成物としてヨモギ抽出物を使用する場合は、食品又は飲料中に、抽出物乾燥重量換算で好ましくは0.0001重量%以上含有させるのが好適である。例えばヨモギ10gを150mlの水中で60℃、1時間処理し抽出物を調製すればよい。またヨモギ抽出物中の3,5-ジカフェオイルキナ酸をHGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中に、3,5-ジカフェオイルキナ酸が好ましくは0.0005重量%以上含有されるのが好適である。

またヨモギ抽出物中のクロロゲン酸をHGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中に、クロロゲン酸を好ましくは0.001重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてアシタバ由来のクロロゲン酸をHGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中に好ましくは0.001重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、HGF産生増強物質を含む組成物として菊花抽出物を使用する場合は、例えば菊花の熱水抽出物、例えば10gの菊花を100mlの水中で60℃、2時間加熱処理したものを、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは1重量%以上含有させればよい。

本発明において、HGF産生増強物質を含む組成物として紫ウコン抽出物を使用する場合は、例えば紫ウコンの温水抽出物、例えば20gの紫ウコンを100mlの水中で60℃、2時間加熱処理したものを、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは0.001重量%以上含有させればよい。

本発明において、HGF産生増強物質を含む組成物としてプラム抽出物を使用する場合は、例えばプラムのエタノール抽出物、例えば60gのプラムを100mlのエタノールで抽出処理したものを、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは0.1重量%以上含有させればよい。また抽出物中の5-カフェオイルキナ酸又は4-カフェオイルキナ酸をHGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中に、5-カフェオイルキナ酸又は4-カフェオイルキナ酸を好ましくは0.01重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、HGF産生増強物質を含む組成物としてブロッコリー抽出物を使用する場合は、例えばブロッコリーの50%エタノール抽出物、例えば100gのブロッコリーを100mlの50%エタノール抽出処理したものを、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは0.2重量%以上含有させればよい。

本発明において、HGF産生増強物質を含む組成物として春菊抽出物を使用する場合は、例えば春菊の温水抽出物、例えば10gの春菊粉碎物をエタノールで洗浄し、100mlの水で60℃、1時間抽出処理したものを、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは0.1重量%以上含有させればよい。

また例えば、春菊のエタノール抽出物、例えば春菊50gを80%エタノール1リットルでホモゲナイズし、得られる抽出物を、食品又は飲料中に、0.1重量%以上含有させるのが好適である。また抽出物中の3,5-ジカフェオイルキナ酸を含有させる場合は、食品又は飲料中に好ましくは0.0005重量%以上である。

本発明において、ビール類、例えばビール、発泡酒、ノンアルコールビール飲料をHGF産生増強物質を含む組成物として使用する場合は、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは2重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、HGF産生増強物質を含む組成物として大豆抽出物を使用する場合は、例えば大豆由来物質の温水抽出物、例えば大豆胚芽、大豆種皮、又はソヤミールをそれぞれエタノール洗浄後、水で60℃、2時間処理して得られる抽出物を使用すればよく、更にこの抽出物をエタノール可溶画分とエタノール不溶画分に分画したものを使用することができる。

例えば、大豆胚芽細断物10gをエタノールで洗浄し、水200mlで60℃、2時間処理し、得られる抽出液に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分とエタノール不溶画分に分別することができる。食品又は飲料中に、当該エタノール可溶画分は乾燥重量換算で好ましくは0.02重量%以上含有させるのが好適であり、エタノール不溶画分は好ましくは0.01重量%以上含有させるのが好適である。

例えば、大豆種皮細断物10gをエタノールで洗浄し、水70mlで60℃、2時間処理し、得られる抽出物に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分とエタノール不溶画分に分別することができる。食品又は飲料中に、当該エタノール可溶画分は乾燥重量換算で好ましくは0.01重量%以上含有させるのが好適であり、エタノール不溶画分は好ましくは0.003重量%以上含有させるのが好適である。

例えば、ソヤミール細断物10gをエタノールで洗浄し、水100mlで60℃

℃、2時間処理し、得られる抽出液に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分とエタノール不溶画分に分別することができる。食品又は飲料中に、当該エタノール可溶画分は乾燥重量換算で好ましくは0.01重量%以上含有させるのが好適であり、エタノール不溶画分は好ましくは0.005重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、HGF産生増強物質を含む組成物としてモロヘイヤ抽出物を使用する場合は、例えばモロヘイヤ葉の温水抽出物、例えば10gのモロヘイヤ粉末をエタノールで洗浄したものを80mlの水で60℃、2時間抽出処理し、得られる抽出物に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分とエタノール不溶画分に分別しものを使用することができる。食品又は飲料中に、当該エタノール可溶画分は乾燥重量換算で好ましくは0.0002重量%以上含有させるのが好適であり、エタノール不溶画分は好ましくは0.0004重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、HGF産生増強物質を含む組成物として米ぬか抽出物を使用する場合は、例えば米ぬかの温水抽出物、例えば10gの米ぬかをエタノールで洗浄し、100mlの水で60℃、2時間抽出処理し、得られる抽出物に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分とエタノール不溶画分に分別したものを使用することができる。食品又は飲料中に、当該エタノール可溶画分は乾燥重量換算で好ましくは0.1重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、NGF産生増強物質を含む組成物としてベニバナ色素を使用する場合は、食品又は飲料中に好ましくは0.1重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてベニバナ由来サフロミンAをNGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中に好ましくは0.3重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、NGF産生増強物質を含む組成物として菊花抽出物を使用す

る場合は、例えば菊花の温水抽出物、例えば10gの菊花を100mlの水中で60℃、2時間加熱処理したものを、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で2重量%以上含有させればよい。また本発明において菊花由来グアイアノライドをNGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中に好ましくは0.002重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、NGF産生増強物質を含む組成物としてアシタバ抽出物を使用する場合は、例えば菊花の温水抽出物、例えば10gのアシタバ葉茎部を200mlの水中で60℃、2時間加熱処理したものを、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは0.04重量%以上含有させればよい。本発明において、NGF産生増強物質を含む組成物としてアシタバ根部抽出物を使用する場合は、例えば10gのアシタバ根部を200mlの水中で60℃、2時間加熱処理したものを、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは0.06重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてアシタバ由来キサントアンゲロールをNGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中に好ましくは0.001重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてアシタバ由来3'-O-β-D-グルコピラノイル ケラクトンをNGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中に好ましくは0.005重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてアシタバ由来7-O-β-D-グルコピラノシルオキシ-8-プレニルクマリンをNGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中に好ましくは0.003重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてアシタバ由来コーヒー酸メチルエステルをNGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中に好ましくは0.002重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてアシタバ由来8-カルボキシル-3-ヒドロキシ-5-メトキ

シルー２－ジメチルクロマンをNGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中に好ましくは0.0003重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてアシタバ由来7-β-D-グルコピラノシルオキシ－6-プレニルクマリンをNGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中に好ましくは0.03重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてアシタバ由来4'-O-アングロイル－3'-O-[6-O-(β-D-グルコピラノシル)－β-D-グルコピラノシル]－ケラクトンをNGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中に好ましくは0.04重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてアシタバ由来コーヒー酸エチルエステルをNGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中に好ましくは0.04重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてタマネギ薄皮抽出物をNGF産生増強物質として使用する場合は、例えばタマネギ薄皮のエタノール抽出物、例えばタマネギ薄皮25gをエタノール500mlで抽出して得た抽出物を、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは0.01重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、NGF産生増強物質を含む組成物としてイチョウ茶葉抽出物を使用する場合は、例えばイチョウ茶葉の熱水抽出物、例えばイチョウ茶葉3gを水200ml中で、100℃、1時間抽出して得られる抽出物を、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは0.07重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてバラ花抽出物をNGF産生増強物質として使用する場合は、例えばバラ花の温水抽出物、例えばバラ花2gを水40mlで、60℃、1時間抽出して得られる抽出物を、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは0.008重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてホップ由来キサントフモールをNGF産生増強物質として使用



する場合は、食品又は飲料中に好ましくは0.0003重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、NGF産生増強物質を含む組成物としてホップエキスを 사용하는場合は、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは0.0001重量%以上、より好ましくは0.001重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてキサントフモールB、キサントフモールDをNGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中にそれぞれを好ましくは0.002重量%以上含有させるのが好適である。

本発明においてイソキサントフモールをNGF産生増強物質として使用する場合は、食品又は飲料中にそれぞれを好ましくは0.008重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、NGF産生増強物質を含む組成物としてビール類、例えばビール、発泡酒、ノンアルコールビール飲料を使用する場合は、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは2重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、NGF産生増強物質を含む組成物としてホップエキスを 사용하는場合は、食品又は飲料中にキサントフモールを好ましくは0.000004重量%以上、イソキサントフモールを好ましくは0.00013重量%以上含有させるようにホップエキスを含有させるのが好適である。

また本発明において、NGF産生増強物質を含む組成物としてホップエキスを 使用する場合は、例えばホップのエタノール抽出物、例えばホップ乾燥物粉碎物 50gを1リットルのエタノールで抽出して得た抽出物を、食品又は飲料中に、乾燥重量換算で好ましくは0.0001重量%以上、より好ましくは0.001重量%以上含有させればよい。

本発明において、NGF産生増強物質を含む組成物として紫ウコン抽出物を使用 する場合は、例えば紫ウコンの温水抽出物、例えば紫ウコン5gを水25mlで、60℃、2時間抽出して得られる抽出物を、食品又は飲料中に乾燥重量換算

で好ましくは0.06重量%以上含有させるのが好適である

本発明において、NGF産生増強物質を含む組成物として大豆抽出物を使用する場合は、例えば大豆由来物質の温水抽出物、例えば大豆胚芽、大豆種皮、又はソヤミールをそれぞれエタノール洗浄後、水で60℃、2時間処理して得られる抽出物を使用すればよく、更にこの抽出物をエタノール可溶画分とエタノール不溶画分に分画したものを使用することができる。

例えば、大豆胚芽細断物10gをエタノールで洗浄し、水200mlで60℃、2時間処理し、得られる抽出物に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分とエタノール不溶画分に分別することができる。食品又は飲料中に、当該エタノール可溶画分は乾燥重量換算で好ましくは0.5重量%以上含有させるのが好適であり、エタノール不溶画分は好ましくは0.3重量%以上含有させるのが好適である。

例えば、大豆種皮細断物10gをエタノールで洗浄し、水70mlで60℃、2時間処理し、得られる抽出物に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分とエタノール不溶画分に分別することができる。食品又は飲料中に、当該エタノール可溶画分は乾燥重量換算で好ましくは0.3重量%以上含有させるのが好適であり、エタノール不溶画分は好ましくは0.06重量%以上含有させるのが好適である。

例えば、ソヤミール細断物10gをエタノールで洗浄し、水100mlで60℃、2時間処理し、得られる抽出物に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分とエタノール不溶画分に分別することができる。食品又は飲料中に、当該エタノール可溶画分は乾燥重量換算で好ましくは0.3重量%以上含有させるのが好適であり、エタノール不溶画分は好ましくは0.006重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、NGF産生増強物質を含む組成物としてモロヘイヤ抽出物を使用する場合は、例えばモロヘイヤ葉の温水抽出物、例えば10gのモロヘイヤ

粉末をエタノールで洗浄し、80 mlの水で60℃、2時間抽出処理し、得られる抽出物に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分とエタノール不溶画分に分別しものを使用することできる。食品又は飲料中に、当該エタノール可溶画分は乾燥重量換算で好ましくは0.05重量%以上含有させるのが好適であり、エタノール不溶画分は好ましくは0.0005重量%以上含有させるのが好適である。

本発明において、NGF産生増強物質を含む組成物として米ぬか抽出物を使用する場合は、例えば米ぬかの温水抽出物、例えば10gの米ぬかをエタノールで洗浄したものを100 mlの水で60℃、2時間抽出処理し、得られる抽出物に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分とエタノール不溶画分に分別したものを使用することできる。食品又は飲料中に、当該エタノール可溶画分は乾燥重量換算で好ましくは0.05重量%以上、エタノール不溶画分は好ましくは0.05重量%以上含有させるのが好適である。

たとえば、本発明のHGF産生増強用の食品又は飲料は、以下のようにして公知の方法により製造することができる。

(1) ウーロン茶葉に対し抽出溶媒を加えて抽出し、抽出物をエチルアルコール及びその他成分と混合することによりアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該抽出物を、当該抽出物の100倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(2) タケの葉粉末に対し抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し、抽出物の凍結乾燥物を調製し、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該乾燥物を0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加することにより、イソオリエンチンが100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含まれるアルコール含有飲料を調製できる。

(3) タマネギ薄皮に対し抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し、抽出物を用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、

当該抽出物を、当該抽出物の100倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(4) イチョウ茶葉に対し抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、100℃で15分間抽出）、抽出物の凍結乾燥物を調製し、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該乾燥物を、当該乾燥物の100倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(5) ヨモギ乾燥品に対し抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、60℃で1時間抽出）、抽出物を用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該抽出物から得られる3, 5-ジカフェオイルキナ酸を5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。また、当該抽出物から得られるクロロゲン酸を40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(6) アシタバ（葉茎部）乾燥品に対し抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、60℃で1時間抽出）、抽出物を用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該抽出物から得られるクロロゲン酸を10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(7) 菊花乾燥物に対し抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、60℃で2時間抽出）、抽出物を用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該抽出物を、当該抽出物の100倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(8) 紫ウコン乾燥品に対し抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、60℃で2時間抽出）、抽出物の凍結乾燥物を調製し、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該乾燥物を10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(9) プラムに対し抽出溶媒（たとえば、エタノール）を加えてホモゲナイズ

し、ろ過によりろ液を調製し、得られた抽出物を用いて、前記（１）と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該抽出物を、当該抽出物の１０００倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。また、当該抽出物から得られる５－カフェオイルキナ酸及び４－カフェオイルキサン酸を各々１００μg/mlとなるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

（１０）ブロッコリーに対し抽出溶媒（たとえば、５０％エタノール水溶液）を加えてホモゲナイズし、ろ過によりろ液を調製し、当該ろ液を濃縮する。得られた濃縮物を用いて、前記（１）と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該濃縮物を、当該濃縮液の１０００倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

（１１）春菊の凍結乾燥物を粉碎し、有機溶媒（たとえば、エタノール）で洗浄後、抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、６０℃で１時間抽出）、抽出物を用いて、前記（１）と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該抽出物を、当該抽出物の１０００倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

（１２）春菊に対し抽出溶媒（たとえば、８０％エタノール）を加えてホモゲナイズし、ろ過によりろ液を調製し、当該ろ液を濃縮する。得られた濃縮物を用いて、前記（１）と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該抽出物を、当該抽出物の１０００倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。また、当該抽出物から得られる３，５－ジカフェオイルキナ酸を１０μg/mlとなるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

（１３）ビールを濃縮し、当該濃縮物を用いて、前記（１）と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該濃縮物を、当該濃縮物の１００倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

（１４）ノンアルコールビール飲料を濃縮し、当該濃縮物を用いて、前記（１）と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該濃縮物を、当該

濃縮物の100倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(15) 大豆胚芽細断物を有機溶媒（たとえば、エタノール）で洗浄した後、抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、60℃で2時間抽出）、抽出物を得る。抽出物をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に有機溶媒（たとえば、2.5倍量のエタノール）を加え、有機溶媒可溶画分と有機溶媒不溶画分に分け、それぞれの乾燥物を調製する。当該乾燥物を用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、エタノール可溶画分の乾燥物を200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。また、エタノール不溶画分の乾燥物を130  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(16) 大豆種皮細断物を有機溶媒（たとえば、エタノール）で洗浄した後、抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、60℃で2時間抽出）、抽出物を得る。抽出物をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に有機溶媒（たとえば、2.5倍量のエタノール）を加え、有機溶媒可溶画分と有機溶媒不溶画分に分け、それぞれの乾燥物を調製する。当該乾燥物を用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、エタノール可溶画分の乾燥物を130  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。また、エタノール不溶画分の乾燥物を30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(17) ソヤミール細断物を有機溶媒（たとえば、エタノール）で洗浄した後、抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、60℃で2時間抽出）、抽出物を得る。抽出物をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に有機溶媒（たとえば、2.5倍量のエタノール）を加え、有機溶媒可溶画分と有機溶媒不溶画分に分け、それぞれの乾燥物を調製する。当該乾燥物を用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、エタノール可溶画分の乾燥物を1

00  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。また、エタノール不溶画分の乾燥物を60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(18) モロヘイヤ葉粉末を有機溶媒（たとえば、エタノール）で洗浄した後、抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、60℃で2時間抽出）、抽出物を得る。抽出物をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に有機溶媒（たとえば、2.5倍量のエタノール）を加え、有機溶媒可溶画分と有機溶媒不溶画分に分け、それぞれの乾燥物を調製する。当該乾燥物を用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、エタノール可溶画分の乾燥物を2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。また、エタノール不溶画分の乾燥物を4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(19) 米ぬかを有機溶媒（たとえば、エタノール）で洗浄した後、抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、60℃で2時間抽出）、抽出物を得る。抽出物をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に有機溶媒（たとえば、2.5倍量のエタノール）を加え、有機溶媒可溶画分を得て、その乾燥物を調製する。当該乾燥物を用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、エタノール可溶画分の乾燥物を1  $\text{mg}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(20) 前記(1)～(19)に記載のアルコール含有飲料に対し常法によりカーボネーションを行い、発泡タイプの飲料を調製することができる。また、各飲料につき、有効成分を前記記載の飲料の20倍量含有させたノンアルコールタイプの飲料を調製することができる。成長因子産生増強物質を高濃度および／または高純度に含有する、これらの飲料は、高いHGF産生増強作用を示し得るので好ましい。

また、たとえば、本発明のNGF産生増強用の食品又は飲料は、以下のように

して公知の方法により製造することができる。

(1) 常法に従い、グレープフルーツ果汁をエチルアルコール及びその他成分と混合することによりアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該グレープフルーツ果汁を、当該果汁の6倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(2) ベニバナ黄色色素を用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該色素を $1.25\text{ mg/ml}$ となるように添加した、サフロミンAが高含有されるアルコール含有飲料を調製できる。

また、ベニバナ乾燥物に対し抽出溶媒(たとえば、水)を加えて抽出し(たとえば、 $60^{\circ}\text{C}$ で2時間抽出)、抽出物の凍結乾燥物を調製し、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該乾燥物を、当該乾燥物に含まれるサフロミンAの量で $3\text{ mg/ml}$ となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

(3) 菊花乾燥物に対し抽出溶媒(たとえば、水)を加えて抽出し(たとえば、 $60^{\circ}\text{C}$ で2時間抽出)、抽出物の凍結乾燥物を調製し、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該乾燥物を $20\text{ mg/ml}$ となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。また、当該乾燥物を、当該乾燥物に含まれるグアイアノライドの量で $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

(4) アシタバ乾燥物(葉茎部)に対し抽出溶媒(たとえば、水)を加えて抽出し(たとえば、 $60^{\circ}\text{C}$ で2時間抽出)、抽出物の凍結乾燥物を調製し、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該乾燥物を $400\text{ }\mu\text{g/ml}$ となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

また、アシタバ乾燥物(根部)に対し抽出溶媒(たとえば、水)を加えて抽出し(たとえば、 $60^{\circ}\text{C}$ で2時間抽出)、抽出物の凍結乾燥物を調製し、前記(1)



）と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該乾燥物を  $600 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

また、当該乾燥物を、当該乾燥物に含まれるキサントアングロールの量で  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

当該乾燥物を、当該乾燥物に含まれる  $3' - \text{O} - \beta - \text{D} - \text{グルコピラノイル}$  ケラクトンの量で  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

当該乾燥物を、当該乾燥物に含まれる  $7 - \text{O} - \beta - \text{D} - \text{グルコピラノシルオキシ} - 8 - \text{プレニルクマリン}$  の量で  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

当該乾燥物を、当該乾燥物に含まれるコーヒー酸メチルエステルの量で  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

当該乾燥物を、当該乾燥物に含まれる  $8 - \text{カルボキシル} - 3 - \text{ヒドロキシ} - 5 - \text{メトキシル} - 2 - \text{ジメチルクロマン}$  の量で  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

当該乾燥物を、当該乾燥物に含まれる  $7 - \beta - \text{D} - \text{グルコピラノシルオキシ} - 6 - \text{プレニルクマリン}$  の量で  $300 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

当該乾燥物を、当該乾燥物に含まれる  $4' - \text{O} - \text{アングロイル} - 3' - \text{O} - [6 - \text{O} - (\beta - \text{D} - \text{グルコピラノシル}) - \beta - \text{D} - \text{グルコピラノシル}] - \text{ケラクトン}$  の量で  $400 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

当該乾燥物を、当該乾燥物に含まれるコーヒー酸エチルエステルの量で  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

(5) タマネギ薄皮に対し抽出溶媒（たとえば、95容量%エチルアルコール）を加えて抽出し、抽出物の凍結乾燥物を調製し、前記(1)と同様にしてアル

コール含有飲料を調製する。たとえば、当該乾燥物を  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

(6) イチョウ茶葉に対し抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、 $100^\circ\text{C}$ で1時間抽出）、抽出物の凍結乾燥物を調製し、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該乾燥物を  $700 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

(7) バラ花に対し抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、 $60^\circ\text{C}$ で1時間抽出）、抽出物の凍結乾燥物を調製し、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該乾燥物を  $80 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

(8) 常法に従い、ホップエキスをを用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該ホップエキスを、当該ホップエキスに含まれるキサントフモールの量で  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

(9) 常法に従い、ホップエキスをを用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該ホップエキスを乾燥重量で  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

(10) 常法に従い、ホップエキスをを用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該ホップエキスを、当該ホップエキスに含まれるキサントフモールBおよびキサントフモールDの総量で  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

(11) 常法に従い、ホップエキスをを用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該ホップエキスを、当該ホップエキスに含まれるイソキサントフモールの量で  $80 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

(12) ビールを濃縮し、当該濃縮物をを用いて、前記(1)と同様にしてアル

コール含有飲料を調製する。たとえば、当該濃縮物を、当該濃縮物の10倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(13) ノンアルコールビール飲料を濃縮し、当該濃縮物を用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該濃縮物を、当該濃縮物の10倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(14) 常法に従い、ホップエキスをを用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該ホップエキスを、当該ホップエキスに含まれるキサントフモールの量が $0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、イソキサントフモールの量が $1.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

また、当該ホップエキスを、当該ホップエキスに含まれるキサントフモールの量が $0.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、イソキサントフモールの量が $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

(15) ホップ乾燥物を粉碎し、抽出溶媒(たとえば、エタノール)を加えて抽出し(たとえば、 $60^\circ\text{C}$ で1時間抽出)、得られた抽出物を濃縮し、当該濃縮物を用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該濃縮物を乾燥重量で $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

(16) 紫ウコン細断物に対し抽出溶媒(たとえば、水)を加えて抽出し(たとえば、 $60^\circ\text{C}$ で2時間抽出)、抽出物の凍結乾燥物を調製し、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、当該乾燥物を $600 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加したアルコール含有飲料を調製することができる。

(17) 大豆胚芽細断物を有機溶媒(たとえば、エタノール)で洗浄した後、抽出溶媒(たとえば、水)を加えて抽出し(たとえば、 $60^\circ\text{C}$ で2時間抽出)、抽出物を得る。抽出物をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に有機溶媒(たとえば、2.5倍量のエタノール)を加え、有機溶媒可溶画分と有機溶媒不溶画分に分け

、それぞれの乾燥物を調製する。当該乾燥物を用いて、前記（１）と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、エタノール可溶画分の乾燥物を  $5 \text{ mg/m l}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。また、エタノール不溶画分の乾燥物を  $3 \text{ mg/m l}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

（１８）大豆種皮細断物を有機溶媒（たとえば、エタノール）で洗浄した後、抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、 $60^\circ\text{C}$ で２時間抽出）、抽出物を得る。抽出物をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に有機溶媒（たとえば、 $2.5$ 倍量のエタノール）を加え、有機溶媒可溶画分と有機溶媒不溶画分に分け、それぞれの乾燥物を調製する。当該乾燥物を用いて、前記（１）と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、エタノール可溶画分の乾燥物を  $3 \text{ mg/m l}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。また、エタノール不溶画分の乾燥物を  $600 \mu\text{g/m l}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

（１９）ソヤミール細断物を有機溶媒（たとえば、エタノール）で洗浄した後、抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、 $60^\circ\text{C}$ で２時間抽出）、抽出物を得る。抽出物をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に有機溶媒（たとえば、 $2.5$ 倍量のエタノール）を加え、有機溶媒可溶画分と有機溶媒不溶画分に分け、それぞれの乾燥物を調製する。当該乾燥物を用いて、前記（１）と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、エタノール可溶画分の乾燥物を  $3 \text{ mg/m l}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。また、エタノール不溶画分の乾燥物を  $60 \mu\text{g/m l}$  となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

（２０）モロヘイヤ葉粉末を有機溶媒（たとえば、エタノール）で洗浄した後、抽出溶媒（たとえば、水）を加えて抽出し（たとえば、 $60^\circ\text{C}$ で２時間抽出）、抽出物を得る。抽出物をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に有機溶媒（たとえば

、2. 5倍量のエタノール)を加え、有機溶媒可溶画分と有機溶媒不溶画分に分け、それぞれの乾燥物を調製する。当該乾燥物を用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、エタノール可溶画分の乾燥物を $500\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。また、エタノール不溶画分の乾燥物を $5\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(21) 米ぬかを有機溶媒(たとえば、エタノール)で洗浄した後、抽出溶媒(たとえば、水)を加えて抽出し(たとえば、 $60^{\circ}\text{C}$ で2時間抽出)、抽出物を得る。抽出物をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に有機溶媒(たとえば、2. 5倍量のエタノール)を加え、有機溶媒可溶画分と有機溶媒不溶画分に分け、それぞれの乾燥物を調製する。当該乾燥物を用いて、前記(1)と同様にしてアルコール含有飲料を調製する。たとえば、エタノール可溶画分の乾燥物を $500\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。また、エタノール不溶画分の乾燥物を $500\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加したアルコール含有飲料を調製できる。

(22) 前記(1)～(21)に記載のアルコール含有飲料に対し常法によりカーボネーションを行い、発泡タイプの飲料を調製することができる。また、各飲料につき、有効成分を前記の飲料の20倍量含有させたノンアルコールタイプの飲料を調製することができる。成長因子産生増強物質を高濃度および/または高純度に含有する、これらの飲料は、高いNGF産生増強作用を示し得るので好ましい。

以上、本発明により植物由来のHGF産生増強物質、NGF産生増強物質を有効成分とする、HGF産生増強用食品又は飲料、NGF産生増強用食品又は飲料が提供される。

例えば本発明により、NGF産生増強物質の有効量を含有する食品又は飲料、ホップエキスを含有し、食品又は飲料中、キサントフモールの含有量が好ましく

は0.00004重量%以上及び／又はイソキサントフォームの含有量が好ましくは0.00013重量%以上であるNGF産生増強用の食品又は飲料が提供され、当該食品又は飲料はNGF産生を要する疾患、例えばパーキンソン病、老年性痴呆、例えばアルツハイマー症、脳血管性痴呆等の症状改善や疾病の予防に極めて有用である。

また、本発明により、植物由来の成長因子産生増強作用を有する有効成分を高含有するアルコール含有飲料が提供される。本明細書においてアルコール含有飲料とはエチルアルコールを含有する飲料をいう。アルコール含有飲料中のエチルアルコール含量は、例えば0.1～50容量%である。また、本発明のアルコール含有飲料を使用した、食品、例えばウイスキーボンボンも提供される。

アルコール含有飲料として好適には、植物由来の成長因子産生増強作用を有する有効成分を高濃度及び／又は高純度に含有するアルコール含有飲料が例示され、例えば植物由来の成長因子産生増強作用を有する有効成分が添加された日本酒、合成清酒、中国酒、パイチュウ、ワイン、ウイスキー、焼酎、ウオッカ、ブランデー、ジン、ラム酒、ビール、発泡酒、清涼アルコール飲料、サワー、カクテル、果実酒、リキュール等が例示される。

前記アルコール含有飲料のエチルアルコール濃度は通常好ましくは0.1～12容量%であり、より好ましくは0.5～8容量%、さらに好ましくは1～6容量%である。使用するアルコールには特に限定はないが、例えば、醸造用アルコール、スピリッツ類（ラム酒、ウオッカ、ジン等）、ウイスキー、ブランデー、又は焼酎等をそれぞれ単独又は併用して用いることができる。

また、当該アルコール含有飲料は、植物由来の成長因子産生増強作用を有する有効成分をエチルアルコール、所望によりその他成分と混合することにより製造することができる。また、エチルアルコール濃度が前記所望の範囲にあるアルコール含有飲料中に所望の植物を浸漬し、当該植物から成長因子産生増強作用を有する有効成分を抽出することにより、本発明のアルコール含有飲料を製造しても

よい。

本発明のアルコール含有飲料は成長因子産生増強用飲料である。本発明の当該飲料の製造には従来より製造されている原材料や方法を用いることができる。例えば原材料として、甘味料、着色料、酸味料、調味料、乳化剤、ビタミン強化剤、食物繊維等の機能性食品素材、香辛料、香料、造粘剤、ミネラル等の食品素材や食品添加物等の飲食可能な物質が使用可能である。

本発明のアルコール含有飲料のpHは、通常の食品の取る範囲で選択することが可能であり、通常はpH 2～7の範囲で選択することが可能である。本発明の清涼アルコール飲料は、カーボネーションの有無は任意である。カーボネーションを行う場合には、製品のガスボリューム1以上が好ましく、より好ましくは1.3～3の範囲である。また本発明のアルコール含有飲料は、果汁、野菜汁、果肉、野菜片の添加も任意に行うことができる。

また本発明により、キサントフモールを食品又は飲料中、0.0003重量%以上含有する成長因子産生増強用の食品又は飲料が提供される。

従来のホップエキス（抽出物）含有飲料であるビール、ノンアルコールビール中には、本発明に使用するキサントフモールが含有されているが、A社製ビール中のキサントフモール含量は0.73  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 、B社製ビール中のキサントフモール含量は2.1  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 、C社製ビール中のキサントフモール含量は0.70  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ であり、いずれのビールも本発明のキサントフモールを0.00007重量%以上含有する飲料には該当しない。

本発明の、食品又は飲料中、キサントフモールを0.00007重量%以上含有する食品又は飲料の製造法としては限定はないが、例えばビール中にキサントフモールを含有するホップエキスを添加してもよく、ノンアルコールビールを原料として使用してもよく、清涼アルコール飲料、嗜好飲料等の製造原料にキサントフモールを含有するホップエキスを使用してもよい。ホップエキスの代わりにホップ自体を使用するのも当然本発明の範囲である。なお、ホップエキス自体を

、本発明の成長因子産生増強用組成物として使用することもできる。

本発明の食品又は飲料中のキサントフモール含量は、生理学的効果と官能結果より決定すればよく、食品又は飲料中、好ましくは0.00007重量%以上含有されていればよく、通常、0.0001～0.001重量%の範囲であるのが好適である。

また本発明は、成長因子産生増強物質を含有する食品、飲料又はその処理物を有効成分として含有する成長因子産生増強用の食品又は飲料を提供する。成長因子産生増強物質を含有する食品又は飲料としては、ビール類が例示される。ビール類としては、ビール、発泡酒、ノンアルコールビール飲料、これらの濃縮物、これらの希釈物、ホップ抽出物含有飲料が例示され、例えばビール、発泡酒を成長因子産生増強用の飲料としてもよく、食品又は飲料の原料としてもよい。またビール類の処理物、例えば濃縮物や希釈物を食品又は飲料の原料としてもよい。

本発明は更に、ホップ抽出物を含有する成長因子産生増強用の食品又は飲料に関する。ホップ抽出物としては市販のホップ抽出物を使用することができ、通常、食品又は飲料中、好ましくは0.0001重量%以上、より好ましくは0.002～0.02重量%含有されていればよい。いずれにしても本発明により開示される方法（たとえば、実施例4－（1）および実施例13）により、ホップエキス中の成長因子産生増強活性を測定し、官能と生理活性の点から、ホップエキスの含有量を決定し、本発明の食品又は飲料を製造すればよい。

本発明により、ホップエキスを含有し、食品又は飲料中にキサントフモールを好ましくは0.00000006重量%以上、イソキサントフモールを好ましくは0.000005重量%以上含有する成長因子産生増強用の食品又は飲料が提供される。

また本発明により、ホップエキスを含有し、食品又は飲料中にキサントフモールを好ましくは0.0000032重量%以上、イソキサントフモールを好ましくは0.00013重量%以上含有する濃厚タイプの成長因子産生増強用食品又



は飲料が提供される。

更に本発明により、ホップエキスを含有し、食品又は飲料中にキサントフモールを好ましくは0.00007重量%以上、イソキサントフモールを好ましくは0.0004重量%以上含有する食品又は飲料が提供され、当該食品又は飲料は高活性の成長因子産生増強作用を有する。

本発明の食品又は飲料としては、成長因子産生増強作用を有する植物由来の成長因子産生増強用組成物が含有されており、その生理機能を発現するための必要量が含有されていれば特にその形状に限定はなく、タブレット状、顆粒状、カプセル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

また、本発明は、有効成分としての成長因子産生増強物質を含有してなる、成長因子産生増強作用を有する生物用の飼料を提供する。当該飼料としては、前記食品又は飲料と同様、前記成長因子産生増強用組成物を含有してなる成長因子産生増強用の飼料、前記成長因子産生増強物質を高濃度及び／又は高純度に含有してなることを特徴とする飼料、前記成長因子産生増強用組成物を高濃度及び／又は高純度に含有してなる飼料、キサントフモールを飼料中、0.00007重量%以上含んでなる神経成長因子産生増強用の飼料、前記成長因子産生増強物質を含有してなる飼料又はその処理物を含有してなる成長因子産生増強用の飼料（好ましくはビール類を含有する態様）、ならびにホップ抽出物を含有してなる成長因子産生増強用の飼料が提供される。使用される成長因子産生増強物質としては、前記食品又は飲料と同様、クロロゲン酸、ジカフェオイルキナ酸、カフェオイルキナ酸、イソオリエンチン、サフロミンA、グアイアノライド、キサントアンゲロール、3'-O-β-D-グルコピラノイル ケラクトン、7-O-β-D-グルコピラノシルオキシ-8-プレニルクマリン、コーヒー酸メチルエステル、コーヒー酸エチルエステル、8-カルボキシル-3-ヒドロキシ-5-メトキシル-2-ジメチルクロマン、7-β-D-グルコピラノシルオキシ-6-プレニルクマリン、4'-O-アングロイル-3'-O-[6-O-(β-D-グル-

コピラノシル) -  $\beta$ -D-グルコピラノシル] - ケラクトン、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールDおよびキサントフモールからなる群より選択される1以上の化合物が好ましい。

さらに、別の一態様として、前記有効成分を生物に投与することを特徴とする生物の飼育方法をも提供する。また、本発明の別の一態様として、前記有効成分を含有することを特徴とする生物飼育用剤が提供される。

これらの発明において、生物とはたとえば養殖動物、ペット動物などであり、養殖動物としては家畜、実験動物、家禽、魚類、甲殻類または貝類が例示される。飼料としては体調の維持および／または改善用飼料が例示される。生物飼育用剤としては浸漬用剤、飼料添加剤、飲料用添加剤が例示される。

これらの発明によれば、それらを適用する前記例示するような生物において、本発明に使用される前記有効成分の成長因子産生増強作用に基づき、本発明の前記治療剤または予防剤と同様の効果の発現が期待できる。すなわち、これらの発明により、当該生物における成長因子産生増強作用を要する疾患の治療または予防効果を期待できる。

本発明に使用される前記有効成分は通常、対象生物の体重1 kg、1日当たり好ましくは0.01～2000 mg投与される。投与は、たとえば、当該有効成分を、対象生物に供する人工配合飼料の原料中に添加混合しておくか、人工配合飼料の粉末原料と混合した後、その他の原料にさらに添加混合することで行うことができる。また、前記有効成分の飼料中の含有量は特に限定されるものではなく、目的に応じて適宜設定すれば良いが、0.001～15重量%の割合が好適である。

人工配合飼料としては、魚粉、カゼイン、イカミールなどの動物性原料、大豆粕、小麦粉、デンプンなどの植物性原料、飼料用酵母などの微生物原料、タラ肝油、イカ肝油などの動物性油脂、大豆油、菜種油などの植物性油脂、ビタミン類、ミネラル類、アミノ酸、抗酸化剤などを原料とする人工配合飼料が挙げられる。

。また魚肉ミンチなどの魚類用飼料が挙げられる。

本発明の飼料の製造法に特に限定はなく、また配合も一般の飼料に準ずるものであればよく、製造された飼料中に成長因子産生増強作用を有する本発明に係る前記有効成分が含まれていればよい。

また、成長因子産生増強作用を有する本発明に係る前記有効成分をプール、水槽、保持タンクまたは飼育領域の水、海水などに直接、添加し、対象生物を浸漬することにより、投与することもできる。この浸漬方法は対象生物の飼料摂取量が低下したときに特に有効である。水または海水中の成長因子産生増強作用を有する本発明に係る有効成分の濃度は特に限定はなく、目的に応じて使用すれば良いが、好ましくは0.00001～1重量%の割合が適当である。

また、成長因子産生増強作用を有する本発明に係る前記有効成分を含有する飲料を飼育用飲料として対象生物に摂取させても良い。該飲料中の成長因子産生増強作用を有する本発明に使用される有効成分の濃度は特に限定はなく、目的に応じて使用すれば良いが、0.00001～1重量%の割合が適当である。成長因子産生増強作用を有する本発明に係る前記有効成分を含んでなる生物飼育用剤、たとえば浸漬用剤、飼料添加剤、飲料用添加剤はそれ自体公知の配合および製造法で製造すれば良い。該生物飼育用剤における有効成分の含有量は、本発明の所望の効果が得られ得る限り特に限定されるものではない。

本発明が適用できる生物としては限定はないが、養殖動物としては、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ラマなどの家畜、マウス、ラット、モルモット、ウサギなどの実験動物、ニワトリ、アヒル、七面鳥、駝鳥などの家禽、マダイ、イシダイ、ヒラメ、カレイ、ブリ、ハマチ、ヒラマサ、マグロ、シマアジ、アユ、サケ・マス類、トラフグ、ウナギ、ドジョウ、ナマズなどの魚類、クルマエビ、ブラックタイガー、タイショウエビ、ガザミなどの甲殻類など、アワビ、サザエ、ホタテ貝、カキなどの貝類、ペット動物としてはイヌ、ネコなどが挙げられ、陸上・水中動物に広く適用できる。

成長因子産生増強作用を有する本発明に使用される前記有効成分を含んでなる飼料を摂取させること、または成長因子産生増強作用を有する本発明に使用される前記有効成分の含有液に対象生物を浸漬することにより、家畜、実験動物、家禽、魚類、甲殻類、貝類、ペット動物などの体調を良好に維持し、または、改善させたりすることができる。

以上のように、本発明により、成長因子産生増強作用を有する種々の医薬品、食品、飲料、飼料等が提供されるが、中でも、本発明の所望の効果の発現の観点から、成長因子産生増強物質としてグアイアノライドを含有してなる成長因子産生増強用組成物、治療剤もしくは予防剤、ならびに食品、飲料もしくは飼料が特に好ましい。

さらに、本発明の別の態様として、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療剤もしくは予防剤、成長因子産生増強剤、または成長因子産生増強用の食品、飲料もしくは飼料の製造における本発明に係る前記有効成分の使用を提供する。かかる使用の態様としては、本発明の前記治療剤もしくは予防剤、成長因子産生増強剤、または成長因子産生増強用の食品、飲料もしくは飼料の製造における前記有効成分の使用の態様を挙げることができる。たとえば、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療剤もしくは予防剤、または成長因子産生増強剤の製造における、前記有効成分の使用としては、前記のような錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤などの固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤などの液剤、また、使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品の製造においての使用が例示される。

なお、本発明で有効成分として使用される成長因子産生増強物質は、ラットに対し1 g/kg体重で経口単回投与しても死亡例は認められない。

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、特段の事情がない限り実施例にお

ける％は重量％を意味する。また、フラクションを画分という場合がある。

### 実施例 1

(1) タケの葉を凍結乾燥後粉碎したタケの葉粉末 6.7 g を 100 ml のクロロホルムに懸濁し、ろ過して不溶画分を回収する操作を 3 回繰り返した。その後、100 ml のエタノールに懸濁してろ過し、不溶画分を回収する操作を 3 回繰り返した。この操作で得た不溶画分からエタノールを完全に除去し、100 ml の蒸留水に懸濁した。この懸濁液を 1 時間 60℃ で保温した後、ろ過した。濾液に 2.5 倍量のエタノールを添加して、-20℃ で冷却した後、低温で遠心分離して沈殿を得た。この沈殿を蒸留水に溶解し、凍結乾燥してパウダー状の糖を含有するタケの葉抽出物を得た。

(2) 実施例 1 - (1) で調製したタケの葉抽出物の 10 mg/ml 水溶液 300  $\mu$ l をマイクロコン 3000 カット (アミコン社製) に入れ、10000 rpm で 90 分間遠心し、フィルターを通り抜けた画分 (下層画分) を調製した。さらに、上層に残留していた画分は、300  $\mu$ l の蒸留水に再溶解し、上層画分を調製した。

### 実施例 2

タマネギの茶色の薄皮 5 g を蒸留水 100 ml に懸濁し、100℃ で 15 分間保温した後、タマネギ薄皮を取り除いて、5% タマネギ薄皮抽出物を得た。

### 実施例 3

イチョウ茶葉 (100% GINKGO、BILOBA TEA : 商品名 GINGOTON、Gingoton Inc., Gardena CA 90248 USA) 3 g を蒸留水 200 ml に懸濁し、100℃ で 15 分間保温した後、ろ過でイチョウ茶葉を取り除いて、上清を得た。この上清を凍結乾燥後、8 ml の蒸留水に溶解し、イチョウ茶葉抽出物を得た。

## 実施例 4

(1) 実施例 1 - (1) で調製したタケの葉抽出物 (試料①)、実施例 1 - (2) で調製した下層画分 (試料②) 上層画分 (試料③) の HGF 産生増強活性を測定した。  $1 \times 10^5$  cells/ml となるように 10% 牛胎児血清を含んだ DME 培地に懸濁した MRC-5 細胞 (CCL 171 : 大日本製薬社製、code. 02-021)  $500 \mu\text{l}$  を 48 穴の細胞培養プレートに入れ、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  存在下で 24 時間培養後に 1% 牛胎児血清を含んだ DME 培地に交換した。その後、試料を添加し、さらに 24 時間培養した後、培地を回収し、Quantikine Human Hepatocyte Growth Factor (HGF) ELISA Kit (フナコシ社製、Code. RS-0641-00) を用いて、培地中の HGF の量を測定した。HGF の産生量は、ネガティブコントロール 100% として表した。試料①は、最終濃度が、0.001、0.01、0.1、 $1 \mu\text{g/ml}$  になるように、試料②、③は、最終濃度が、1、10、 $100 \mu\text{g/ml}$  になるように添加した。ネガティブコントロールとして、試料と同量の蒸留水を添加した。HGF の産生量は、ネガティブコントロール 100% として表した。試料①の結果を表 1 に、試料②、③の結果を表 2 に示した。実験は全て 2 連で行いその平均値を採用した。表 1、2 に示したように、これらの試料は HGF の産生を増強した。特に試料①及び③添加群は、強く HGF の産生量が増加していた。このことより、タケの葉抽出物には、HGF の産生を増強する活性があることが示された。さらに上層画分に HGF 産生増強活性があったことより、分子量 3000 より高分子の物質に HGF 産生誘導活性が認められた。

表 1

試料①濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	HGF 産生量 (%)
0	1 0 0
0. 0 0 1	1 2 3
0. 0 1	1 1 8
0. 1	1 8 2
1	5 7 0

(ただし、コントロールのHGF産生量は8. 7 9 n g / m lであった。)

表 2

試料濃度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	試料②のHGF産生量 (%)	試料③のHGF産生量 (%)
0	1 0 0	1 0 0
1	1 0 6	4 1 7
1 0	1 0 9	5 8 4
1 0 0	2 1 6	4 7 6

(ただし、コントロールのHGF産生量は9. 9 9 n g / m lであった。)

(2) 細かくしたタケの葉約5 gを50% アセトン70m lと共に15分以上攪拌し、得られた抽出液を吸引ろ過し、残渣を再び同量の溶媒で抽出した。この粗抽出液のHGF 産生増強活性を実施例4-(1)と同様の方法で調べたところ、表3に示すように活性が確認された。粗抽出液を減圧濃縮し、濃縮液を水で20倍に希釈し、その一部を10m l分のアンバーライトXAD-2 (オルガノ社製)に供し、30%、40%、50%、60% メタノール水溶液、及びメタノール各30m lで順次溶出した。各画分のHGF 産生誘導活性を測定したところ、40% メタノール、30% メタノール溶出画分に活性が確認された。30%、40% メタノール溶出画分を濃縮・乾固し、クロロホルム：メタノール：酢酸=3 : 1 : 2.5%を展開溶としたシリカカラムクロマトグラフィーに供し、10m lずつ分取した。

$^1\text{H}$ -NMR、FAB-MSにより分析した結果、フラクション19~35本目に、イソオリエンチン(isoorientin)を高濃度に含有する画分が得られ、この画分に表4に示す様にHGF産生増強活性が確認された。

<sup>1</sup>H-NMR

isoorientin :  $\sigma$  7.57(1H, dd, J 8, 2Hz) , 7.55(1H, d, J 2Hz) , 7.02(1H, d, J 8Hz) , 6.81(1H, s), 6.63(1H, d, J 8Hz), 4.74(1H, d, J 10Hz), 4.19(1H, t, J 4.5Hz)

## FAB-MASS

449(M+H)

表 3

タケの葉粗抽出液 (%)	HGF 産生量 (%)
0	1 0 0
0.1	1 9 5
1	4 6 3

(ただし、コントロールのHGF 産生量は9.09 ng/mlであった。)

表 4

イソオリエンチン含有画分 (mg/ml)	HGF 産生量 (%)
0	1 0 0
0.1	1 3 1
1	3 1 8

(ただし、コントロールのHGF 産生量は9.62 ng/mlであった。)

(3) 市販の乾燥プラム約300 gをメタノール 500mlと共にミキサーにかけて磨砕し、吸引ろ過によりろ液を得た。このろ液1 mlを濃縮乾固し、1 mlのDMSOに溶解したプラム粗抽出液のHGF 産生増強活性を調べたところ、表5に示すような活性が確認された。

得られた粗抽出液を濃縮して抽出溶媒を除き、水で1 リットルに希釈し、200mlのアンバーライトXAD-2(オルガノ社製) に供し、500ml のH<sub>2</sub>O で洗浄後、メタノールで吸着画分を溶出した。得られた溶出画分を濃縮後、少量の水に溶解した



後、コスモシール140C<sub>18</sub>-OPN(ナカライテスク社製)に供し、水と25%のアセトニトリル水溶液、合計800mlの勾配で溶出し、約10mlずつ分取した。得られたフラクションを、<sup>1</sup>H-NMRにより分析した結果、26本目～32本目のフラクションと41本目～48本目のフラクションにそれぞれ、5-カフェオイルキナ酸(5-caffeoyl-quinic acid)、4-カフェオイルキナ酸(4-caffeoyl-quinic acid)を高濃度に含む画分を得、それぞれ表6に示すようにHGF産生増強活性が確認された。

#### <sup>1</sup>H-NMR

5-caffeoyl-quinic acid :  $\sigma$  7.63(1H, d, J 15.5Hz), 7.19(1H, s), 7.12(1H, d, J 8Hz), 6.93(1H, d, J 8Hz), 5.40(1H, m), 4.18(1H, m), 3.77(1H, dd, J 9.5, 4.5Hz), 2.2 ~ 1.6(5H, m)

4-caffeoyl-quinic acid :  $\sigma$  7.49(1H, d, J 15.5Hz), 7.04(1H, d, J 4Hz), 6.99(1H, dd, J 8, 4Hz), 6.73(1H, d, J 8Hz), 6.27(1H, d, 16Hz), 4.65(1H, dd, J 8, 3Hz), 4.08 (1H, m), 2.2 ~ 1.6(5H, m)

表5

プラム粗抽出液 (%)	HGF産生量 (%)
0	100
0.01	111
0.1	214
1	306

(ただし、コントロールのHGF産生量は8.02ng/mlであった。)

表 6

試料	濃度 (mg/ml)	HGF 産生量 (%)
5-カフェオイルキナ酸	0	100
	0.01	111
	0.1	321
4-カフェオイルキナ酸高含有画分	0	100
	0.01	103
	0.1	142

(ただし、コントロールのHGF産生量は9.98ng/mlであった。)

(4) 市販のブロッコリー約300gを50% エタノール水溶液350mlと共にホモジナイズし、ろ過によりろ液を得た。残渣を50% エタノール水溶液350mlで再度ホモジナイズし、得られたろ液をまとめて150mlに減圧濃縮した。この濃縮液のHGF産生増強活性を実施例4-(1)と同様に調べたところ、表7に示すようにHGF産生増強活性が確認された。

表 7

ブロッコリー粗抽出液 (%)	HGF 産生量 (%)
0	100
0.01	105
0.1	173
1	258

(ただし、コントロールのHGF産生量は6.80ng/mlであった。)

#### 実施例 5

実施例2で調製したタマネギ薄皮抽出物(試料①)、実施例3で調製したイチヨウ葉抽出物(試料②)のHGF産生増強活性を実施例4-(1)と同様の方法で検討した。それぞれの試料を蒸留水で1、10、100倍希釈し、それぞれの希釈液5μlを培地に添加した。ネガティブコントロールとして、試料と同量の

蒸留水を添加した。HGFの産生量は、ネガティブコントロール100%として表した。その結果を表8に示した。実験は全て2連で行いその平均値を採用した。表8に示したように、試料①、②はHGFの産生を増強した。このことより、タマネギ薄皮抽出物、イチヨウ葉抽出物はHGF産生増強活性があることが示された。

表 8

試料濃度	試料①HGF産生量 (%)	試料②HGF産生量 (%)
0	100	100
100倍希釈	122	214
10倍希釈	266	358
1倍希釈	248	199

(ただし、コントロールのHGF産生量は10.01ng/mlであった。)

#### 実施例 6

(1) キク科植物であるヨモギとして、サザバルヨモギを収穫後、3年熟成させたものを使用し、当該熟成物を水洗後、蒸気加熱方式の抽出機で、100～105℃、7時間の熱水抽出を行い、ヨモギ抽出物を調製した。この抽出物をさらに24時間煎じてアメ状とし、次に製錠機で錠剤化した。

(2) 実施例6-(1)で調製した錠剤(泉湖食品社製)を粉碎した粉末15.563gを100mlのクロロホルムに懸濁し、ろ過して不溶画分を回収する操作を2回繰り返した。その後、100mlのエタノールに懸濁してろ過し、不溶画分を回収する操作を2回繰り返した。この操作で得た不溶画分からエタノールを完全に除去し、100mlの蒸留水に懸濁した。この懸濁液を1時間60℃で保温した後、ろ過した。濾液に2.5倍量のエタノールを添加して、-20℃で冷却した後、低温で遠心分離して沈殿を得た。この沈殿を蒸留水に溶解し、凍結乾燥してパウダー状の糖を含有する画分を得た。

(3) 実施例 4 - (1) と同様の方法で実施例 6 - (2) で調製したサザバルヨモギ抽出物の HGF 産生増強活性を検討した。サザバルヨモギ抽出物は、最終濃度が 1、10、100  $\mu\text{g/ml}$  になるように添加した。ネガティブコントロールとして、試料と同量の蒸留水を添加した。HGF の産生量は、ネガティブコントロール 100% として表した。その結果を表 9 に示した。実験は全て 2 連で行いその平均値を採用した。表 9 に示したように、サザバルヨモギ抽出物は HGF 産生を増強した。

表 9

サザバルヨモギ抽出物濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	HGF 産生量 (%)
0	100
1	114
10	196
100	771

(ただし、ネガティブコントロールの HGF 産生量は 5.27 ng/ml であった。)

#### 実施例 7

(1) アシタバ乾燥品 (阪本漢方堂社製) 480g を酢酸エチル 1 リットルで 2 回、エタノール 1 リットルで 2 回抽出した残渣に水 2 リットルを添加し 60°C、1 時間抽出した。抽出液を 250ml に濃縮した後、エタノール 50ml を添加し、不溶物質を除去した後、得られた上澄を減圧濃縮した。濃縮物の約半分を XAD-2 (オルガノ社製) 300ml に供し、水 600ml で洗浄した後、吸着画分を 30% メタノール 600ml (画分 1)、60% メタノール 500ml (画分 2)、100% メタノール 600ml (画分 3) の順に段階的に溶出した。これらの溶出液を乾固した後、それぞれ 50ml の水に溶解し、各画分の HGF 産生増強活性を実施例 4 - (1) と同様の方法にて測定した。ただし、それぞれの画分を最終濃度が 0.01、0.1、1% となるように添加した。その結果を表 10 に示した。実験は 2 連で行ない、その平均値を採用した。

。表 1 0 に示すようにこれらの画分はいずれも H G F 産生増強活性を示した。

表 1 0

試料	最終濃度 (%)	H G F 産生量 (%)
画分 1	0 . 0 1	1 1 1
	0 . 1	1 5 0
	1	3 6 4
画分 2	0 . 0 1	1 6 2
	0 . 1	2 2 3
	1	3 8 8
画分 3	0 . 0 1	1 0 7
	0 . 1	1 4 5
	1	2 7 4

(ただし、コントロールの H G F 産生量は 10.88 ng/ml であった。)

(2) 更に、画分 3 をブタノール : エタノール : 酢酸 : 水 = 10 : 10 : 1 : 1 を展開溶媒としたシリカゲルプレート (メルク社製) 上で展開し、分画を行い、各スポットの H G F 産生増強活性を実施例 4 - (1) と同様の方法で測定した。その結果、Rf 値 0.3 付近の UV 254nm に吸収を示す化合物 (以下、化合物 (1) と示す) に H G F 産生増強活性が存在した。この化合物 (1) を、<sup>1</sup>H-NMR で解析したところ第 1 図に示すようにクロロゲン酸標品 (シグマ社製) のものと一致し、化合物 (1) はクロロゲン酸であることが確認された。また、クロロゲン酸標品の H G F 産生増強活性を実施例 4 - (1) と同様の方法で、検討したところ表 1 1 に示す様に確かにその H G F 産生増強活性が確認された。

表 1 1

クロロゲン酸濃度 ( $\mu$ M)	HGF 産生量 (%)
0	1 0 0
1	1 0 5
1 0	1 2 2
1 0 0	3 0 2
5 0 0	4 7 9
1 0 0 0	6 2 4

(ただし、コントロールのHGF産生量は8.10 ng/mlであった。)

(3) 更に、クロロゲン酸標品をスタンダードとして、HPLC(TSKgel ODS-80Ts (東ソー社製)、A液:水(0.1%TFA含有)、B液:50%アセトニトリル(0.1%TFA含有)、0分-B 25%、20分-B 75%)で画分1~3の中に含まれるクロロゲン酸量を分析し、その結果を表12に示した。

表 1 2

	クロロゲン酸濃度 (mM)
画分 1	7. 5
画分 2	3 5. 7
画分 3	5. 3

また、表10、12の結果から画分1~3に含まれるクロロゲン酸濃度と各画分のHGF産生増強活性の相関関係を第2図に、表11の結果からクロロゲン酸標品濃度とHGF産生増強活性の相関関係を第3図に示した。これらの相関関係はほぼ一致した。このことから、各画分のHGF産生増強活性は主にクロロゲン酸によるものであることが確認された。なお、第2図、第3図において、横軸は

クロロゲン酸濃度の対数、縦軸はHGF濃度を示す。

#### 実施例 8

ヨモギ乾燥品（阪本漢方堂社製）40g を50%アセトン 500m l で3 回抽出した後、約15mlに減圧濃縮した。濃縮液に10%クエン酸水溶液を35ml添加し、酢酸エチル100mL で3 回抽出した後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥、減圧濃縮した。濃縮物をクロロホルム：メタノール：酢酸=2：1：1 を展開溶媒としたシリカクロマトグラフィーに供じ、8mL ずつ分取した。得られた、フラクション7～13を集め、減圧濃縮した後、クロロホルム：メタノール：酢酸=1：1：0.05を展開溶媒としたシリカゲルプレート上で展開し、R f 値0.5 付近のUV 254nmに吸収を示す物質（以下、化合物（2）と称す。）225mg を回収した。この物質の構造を<sup>1</sup>H-核磁気共鳴(NMR) スペクトル(JNM-A500：日本電子社製)により構造解析した。

<sup>1</sup> H-NMR:  $\sigma$  7.46(1H, d, J 15.5Hz), 7.45(1H, d, J 15.5Hz), 7.02(1H, m), 7.00(1H, m), 6.93(2H, m), 6.72(1H, d, J 8.5Hz), 6.70(1H, d, J 8.5Hz), 6.20(1H, d, J 15.5Hz), 6.17(1H, d, J 15.5Hz), 5.33(1H, td, J 10.5, 4.5 Hz), 5.13(1H, m), 3.68(1H, dd, J 10, 3Hz), 2.2~1.6(5H, m)

第4図に<sup>1</sup> H-NMRスペクトルを示す。第4図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。これらの結果から、化合物（2）は、3,5-ジカフェオイルキナ酸であることが確認された。3,5-ジカフェオイルキナ酸のHGF産生増強活性を実施例4-(1)と同様の方法でHGF産生増強活性を検討した。その結果、表13に示すように3,5-ジカフェオイルキナ酸はHGF産生増強活性を有することが分かった。

表 1 3

3,5-ジカフェオイルキナ酸濃度 ( $\mu$ M)	HGF 産生量 (%)
1	1 4 2
1 0	2 0 6
1 0 0	2 9 0

(ただし、コントロールのHGF産生量は6.27 ng/mlであった。)

## 実施例 9

(1) ヨモギ乾燥品(阪本漢方堂社製) 10g を細断し、クロロホルム100ml で5回、エタノール100ml で5回抽出した残渣に、水150ml を加え、60度で1時間抽出し、抽出ろ液を得た。このろ液131ml にエタノール326ml を加え、-20度で30分静置後、遠心を行ない、得られた上澄を凍結乾燥し、ヨモギ熱水抽出低分子画分(画分4)を得た。これを水4.5ml に溶解し、最終濃度が0.01、0.1%となるように添加し、HGF産生増強活性を実施例4-(1)と同様の方法で検討した。その結果、表14に示すように画分4にHGF産生増強活性があることが分かった。

表 1 4

画分4終濃度 (%)	HGF 産生量 (%)
0. 0 1	2 5 8
0. 1	2 9 4

(ただし、コントロールのHGF産生量は7.76 ng/mlであった。)

(2) また、画分4に含まれる、クロロゲン酸、3,5-ジカフェオイルキナ酸の含量を実施例7-(3)と同様の方法で定量したところ、サンプル原液中にそれぞれ7.7mM、13mMの濃度で含まれていた。以上の結果から、クロロゲン酸、3,5-



ジカフェオイルキナ酸は、それぞれヨモギ抽出物によるHGF 産生増強活性の活性物質の1つであることが明らかになった。

#### 実施例 10

(1) 国産菊花(ほし菊: JA青森経済連JA南部町製) 15g を凍結乾燥後、細断したものに1000mlのクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固しクロロホルム抽出画分を得た。つぎに、残渣に500ml のエタノールを加え室温で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分を得た。つぎに、残渣に150ml の蒸留水を加え60度で2 時間抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分に2.5 倍量のエタノールを加え、マイナス30度で2 時間静置した。その後、10,000 Gの遠心で沈殿物を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固し国産菊花の水抽出画分を得た。

(2) 実施例 10 - (1) で得た国産菊花の水抽出画分のHGF 産生増強活性をを実施例 4 - (1) と同様の方法で検討した。国産菊花の水抽出画分は最終濃度が1 %となるように添加した。その結果、表 15 に示すように国産菊花の水抽出画分にHGF 産生増強活性があることが分かった。

表 15

国産菊花の水抽出画分終濃度 (mg/ml)	HGF 産生量 (%)
4. 0 4	3 8 3

(ただし、コントロールのHGF 産生量は12.51 ng/ml であった。)

(3) 中国産菊花(中国、大連市のローカルマーケットにて入手) 20g を凍結乾燥後、細断したものに500ml のクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固しクロロホルム抽

出画分を得た。つぎに、残渣に500mlのエタノールを加え室温で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分を得た。つぎに、残渣に300mlの蒸留水を加え60度で2時間抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分に2.5倍量のエタノールを加え、マイナス30度で2時間静置した。その後、10,000Gの遠心で沈殿物と液体部分に分画した。液体部分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固し水抽出画分を得た。

(4) 実施例10-(3)で得た中国産菊花の水抽出画分のHGF産生増強活性を実施例4-(1)と同様の方法で検討した。中国産菊花の水抽出画分は最終濃度が1、5、10%となるように添加した。その結果、表16に示すように中国産菊花の水抽出画分にHGF産生増強活性があることが分かった。

表16

中国産菊花の水抽出画分終濃度 (mg/ml)	HGF産生量 (%)
0.71	267
3.55	373
7.10	367

(ただし、コントロールのHGF産生量は12.51 ng/mlであった。)

#### 実施例11

実施例4-(1)と同様の方法で後述の実施例38-(1)で調製した紫ウコンエタノール抽出画分-2、水抽出画分-1、水抽出画分-2のHGF産生増強活性を検討した。エタノール抽出画分-2は最終濃度が10 $\mu$ g/ml、水高分子画分-1は最終濃度が132、1320 $\mu$ g/ml、水高分子画分-2は最終濃度が2.2、22 $\mu$ g/mlになるように添加した。HGFの産生量は、ネガティブコントロール100%として表した。その結果を表17に示した。実験は全て2連で行い、その平均値を採用した。表17に示したように、紫ウコンエタノール抽出画分-2、水抽

出画分－１、水抽出画分－２はHGF産生を増強した。

表 1 7

試料	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	HGF産生量 (%)
紫ウコンエタノール	0	100
抽出画分－２	10	157
紫ウコン水抽出画分－１	0	100
	132	185
	1320	324
紫ウコン水抽出画分－２	0	100
	2.2	182
	22	207

(ただし、コントロールのHGF産生量は13.99ng/mlであった。)

#### 実施例 1 2

(1) 春菊を凍結乾燥し、粉碎したもの10g にクロロホルム100ml を加え攪拌し、濾過して残渣を回収した。このクロロホルム添加、残渣回収を計5 回行なった。残渣にエタノール100ml を加え攪拌し、濾過して残渣を回収した。このエタノール添加、残渣回収を計5 回行なった。残渣に蒸留水100ml を加え、60℃で1 時間保温したのち、濾過した濾液を凍結乾燥し、試料を得た。この抽出物を蒸留水に溶解し、HGF 産生増強活性を実施例 4 － (1) と同様の方法で調べたところ、表 1 8 示すように活性が確認された。

表 1 8

画分 4 終濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	HGF 産生量 (%)
0	1 0 0
1	1 2 5
1 0	1 4 8
1 0 0	3 1 4

(ただし、コントロールのHGF産生量は8.21 ng/mlであった。)

(2) 市販の春菊900 gを凍結乾燥し、80%エタノール2リットルと共にミキサーにかけて磨砕し、ガーゼを用いてろ過を行ない、抽出液を得た。この抽出液を減圧濃縮により200 mlに濃縮し、春菊の粗抽出液を調製した。

次に得られた、粗抽出液100 ml分をアンバーライトXAD-2 樹脂(オルガノ社製) 200mL に供し、水、メタノール30%、40%、60%の各水溶液、メタノール、それぞれ500 mlで順次、溶出した。それぞれの溶出画分を50mlにまで濃縮し、実施例4-(1)と同様の方法で、各画分のHGF 産生増強活性を確認したところ、表19に示すように60% メタノール溶出画分の濃縮物にHGF 産生増強活性が見られた。

なおこの濃縮物は0.1%、10%(容量比)となるように添加した。

この60% メタノール溶出画分を $^1\text{H-NMR}$ で解析したところ、高濃度の3, 5- ジカフェオイルキナ酸が含有されている事が分かった。

表 1 9

試料濃度(%)	0	0.1	1
HGF 産生量(%)	100	220	349

(ただし、コントロールのHGF産生量は8.22 ng/mlであった。)

## 実施例 1 3

マウス繊維芽細胞L-M細胞(ATCC CCL-1.2)を0.5 %のバクトペプトン(ギブコ社製)を含むM199 培地(ICN 社製)で $1.5 \times 10^5$  細胞/mlに懸濁し、96穴プレートに0.1mlずつまき無菌的に培養した。3日間培養後、培地を取り除き、0.5 %のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むM199 培地に置き換えた。これにキク科ベニバナ(*Carthamus tinctorius* LINNE)の花より抽出して得られた黄色色素(粉末サンエローNo.2、三栄源エフ・エフ・アイ社製)を最終濃度が1.25、2.5、5mg/mlとなるように添加し、20時間培養した。培養終了後、培養液中の神経増殖因子の濃度をエンザイムイムノアッセイ法(NGF Emax Immuno Assay System:プロメガ社製)にて測定した。試料を添加していない細胞培養液中のNGF濃度を100%として、NGF産生増強を表した。実験は2連で行い、その平均値を採用した。その結果、ベニバナ黄色色素は濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。その結果を表20に示す。

表 2 0

ベニバナ黄色色素濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
0	100
1.25	277.6
2.5	441.3
5	808.4

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.507 ng/mlであった。)

## 実施例 1 4

実施例13に記載のベニバナ黄色色素中の活性成分を逆相クロマトグラフィーを用いて精製単離した。以下にその条件について示す。カラムはTSK gel ODS-80 Ts(径21.5mm×長30cm:東ソー社製)を用いた。溶媒A(0.1%トリフルオロ酢酸

水溶液)と溶媒B(蒸留水とアセトニトリルを容量比1対1で混合したもので0.1%トリフルオロ酢酸を含む)の溶出比は0分から50分にかけて溶媒B比を直線的に0%から100%に、続く15分間は溶媒B比を100%に保持、最後に溶媒B比を0%にし15分間保持とした。溶出速度は5ml/分、検出は215nmで行った。3分後ごとにフラクションを採取し、各フラクションのNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。その結果、32.5分と41.8分のピークを含むフラクションにNGF産生増強活性があることが明らかになった。32.5分のピークを含むフラクションについてマスマスペクトル解析を行ったところ、分子量が613のシグナルが検出された。さらに、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル、<sup>13</sup>C-NMRスペクトル解析の結果、活性成分がサフロミンA(分子量612.53)であることを確定した。このようにして得られた精製サフロミンAのNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。精製サフロミンAは2.5mg/mlとなるように添加した。その結果、精製したサフロミンAはL-M細胞のNGF産生を増強した。サフロミンAの結果については表21に、41.8分のピークを含むフラクションの結果については表22に示す。

表21

サフロミンA濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
0	100
2.5	130.7

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.739 ng/mlであった。)

表 2 2

分画ベニバナ黄色色素フラクション濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
0	1 0 0
1. 2 5	3 5 0. 7
2. 5	6 4 3. 4

(ただし、ネガティブコントロールのNGF 産生量は0.736 ng/ml であった。)

### 実施例 1 5

キク科ベニバナ (*Carthamus tinctorius* LINNE : 阪本漢方堂製) 10g を細断したものに800 mlのクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固しクロロホルム抽出画分を得た。つぎに、残渣に1400 ml のエタノールを加え室温で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分を得た。つぎに、残渣に150 mlの蒸留水を加え60度で2時間抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分に2.5 倍量のエタノールを加え、マイナス30度で2 時間静置した。その後、10,000 Gの遠心で沈殿物を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固し水抽出画分を得た。このようにして調製した各画分のNGF 産生増強活性を実施例 1 3 と同様の方法で測定した。ベニバナクロロホルム抽出画分は0.393 、0.785 mg/ml となるように添加した。エタノール抽出画分は0.313 、0.625 mg/ml となるように添加した。水抽出画分は2.76、5.51 mg/mlとなるように添加した。その結果を表 2 3 に示した。ベニバナクロロホルム抽出画分、エタノール抽出画分、水抽出画分は、濃度依存的にL-M細胞のNGF 産生を増強した。

表 2 3

試料	濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
ベニバナクロロホルム抽出画分	0	100
	0.393	535.6
	0.785	986.0
ベニバナエタノール抽出画分	0	100
	0.313	345.3
	0.625	1449.5
ベニバナ水抽出画分	0	100
	2.76	477.8
	5.51	806.3

(ただし、ネガティブコントロールのNGF産生量は0.190 ng/ml であった。)

#### 実施例 1 6

国産菊花 (*Chrysanthemum morifolium*、ほし菊：JA青森経済連JA南部町製) 15 g を凍結乾燥後、細断したものに1000mlのクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固しクロロホルム抽出画分を得た。つぎに、残渣に500ml のエタノールを加え室温で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分を得た。つぎに、残渣に150ml の蒸留水を加え60度で2 時間抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分に2.5 倍量のエタノールを加え、マイナス30度で2 時間静置した。その後、10,000Gの遠心で沈殿物を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固し水抽出画分を得た。このようにして調製した各画分のNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。菊花クロロホルム抽出画分は1.8、3.6、7.2mg/mlとなるように添加した。菊花エタノール抽出画分は0.517、1.03、2.07mg/ml となるように添加した。菊花水抽出画



分は16.8、33.7、67.3mg/ml となるように添加した。その結果、菊花クロロホルム抽出画分、エタノール抽出画分、水抽出画分は、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。それらの結果を表24～26に示す。

表24

国産菊花クロロホルム抽出画分濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
0	100
1.80	209.6
3.60	447.3
7.20	1019.9

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.474 ng/mlであった。)

表25

国産菊花エタノール抽出画分濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
0	100
0.517	164.6
1.03	195.3
2.07	265.1

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.474 ng/mlであった。)

表26

国産菊花水抽出画分濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
0	100
16.8	200.2
33.7	257.6
67.3	336.9

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.474 ng/mlであった。)

## 実施例17

(1) 国産菊花(ほし菊: JA青森経済連JA南部町製) 245 g を凍結乾燥後、細断したものに9000 ml のクロロホルムを加え室温で抽出をおこない、クロロホルム抽出液とクロロホルム抽出残渣に分画した。クロロホルム抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮し、菊花クロロホルム抽出物を得た。

(2) 菊花クロロホルム抽出物をシリカクロマトに供しクロロホルム: メタノール = 100:1 (1250 ml) を溶出溶媒として溶出し、1 フラクション8 mlずつ分取した。得られたフラクション44~99を減圧濃縮し国産菊花クロロホルム抽出画分Aを得た。次にメタノール(400 ml) を溶出溶媒として溶出をし、溶出物を減圧濃縮し国産菊花クロロホルム抽出画分Bを得た。

(3) 実施例17-(2)で調製した画分A、画分BのNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。画分Aは0.5、1.0、2.0 mg/ml となるように添加した。画分Bは0.5、1.0、2.0 mg/ml となるように添加した。その結果を表27に示した。画分A、画分Bは、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 27

試料	濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
国産菊花クロロホルム 抽出画分A	0	100
	0.5	114.0
	1.0	304.6
	2.0	677.0
国産菊花クロロホルム 抽出画分B	0	100
	0.5	121.3
	1.0	134.9
	2.0	154.4

(ただし、ネガティブコントロールのNGF産生量は0.190 ng/ml であった。)

#### 実施例 18

(1) 実施例17-(2)で調製した国産菊花クロロホルム抽出画分Aをさら

にシリカクロマトに供し酢酸エチル：ヘキサン=1:10 (500 ml)、1:8 (500 ml)、1:6 (500 ml)、1:4 (500 ml)の順に段階的に溶出し、1 フラクション6 mlずつ分取した。得られたフラクション264 ~290 を減圧濃縮し国産菊花クロロホルム抽出画分A-aを得た。得られたフラクション206 ~240 を減圧濃縮し国産菊花クロロホルム抽出画分A-bを得た。得られたフラクション241 ~263 を減圧濃縮し国産菊花クロロホルム抽出画分A-cを得た。得られたフラクション291 ~320 と続いてメタノール (400 ml) を展開溶媒として得られた溶出物を合わせたものを減圧濃縮し国産菊花クロロホルム抽出画分A-dを得た。

(2) 実施例18-(1)で調製した画分A-a、画分A-b、画分A-c、画分A-dのNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。画分A-aは0.125、0.25 mg/mlとなるように添加した。画分A-bは0.25、0.5 mg/mlとなるように添加した。画分A-cは0.25、0.5 mg/mlとなるように添加した。画分A-dは0.25、0.5 mg/mlとなるように添加した。その結果を表28、29に示した。画分A-a、画分A-b、画分A-c、画分A-dは、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 28

試料	濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
国産菊花クロロホルム 抽出画分A-a	0	100
	0.125	120.0
	0.25	280.6
国産菊花クロロホルム 抽出画分A-b	0	100
	0.25	216.1
	0.5	959.1
国産菊花クロロホルム 抽出画分A-c	0	100
	0.25	124.4
	0.5	224.8

(ただし、ネガティブコントロールのNGF産生量は0.489 ng/mlであった。)

表 2 9

国産菊花クロロホルム抽出画分A-d濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
0	100
0.25	157.1
0.5	409.6

(ただし、ネガティブコントロールのNGF産生量は0.575 ng/mlであった。)

### 実施例 1 9

(1) 実施例 1 8 - (1) で調製した国産菊花クロロホルム抽出画分A-aをクロロホルム：メタノール = 50 : 1 を展開溶媒とする薄層クロマト上で展開した。R f 値0.9 ~ 0.95の部分をかきとり、展開溶媒で再溶出して国産菊花クロロホルム抽出画分A-a-1を得た。R f 値0.55 ~ 0.68の部分をかきとり、展開溶媒で再溶出して国産菊花クロロホルム抽出画分A-a-2を得た。R f 値0.30 ~ 0.38の部分をかきとり、展開溶媒で再溶出して国産菊花クロロホルム抽出画分A-a-3を得た。

(2) 実施例 1 9 - (1) で調製した画分A-a-1、画分A-a-2、画分A-a-3のNGF産生増強活性を実施例 1 3と同様の方法で測定した。画分A-a-1は0.25、0.5 mg/mlとなるように添加した。画分A-a-2は0.025、0.05 mg/mlとなるように添加した。画分A-a-3は1.0 mg/mlとなるように添加した。その結果を表 3 0に示した。画分A-a-1、画分A-a-2、画分A-a-3は、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 3 0

試料	濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
国産菊花クロロホルム 抽出画分 A-a-1	0 0.25 0.5	100 193.3 639.1
国産菊花クロロホルム 抽出画分 A-a-2	0 0.025 0.05	100 126.4 871.9
国産菊花クロロホルム 抽出画分 A-a-3	0 1.0	100 220.6

(ただし、ネガティブコントロールの NGF 産生量は 0.183 ng/ml であった。)

(3) 実施例 19-(1) で調製し、実施例 19-(2) で活性を確認した国産菊花クロロホルム抽出画分 A-a-2 の質量スペクトル (MS) を質量分析計 (DX302: 日本電子社製) により FAB-MS の手法で測定した。マトリックスにはニトロメチルベンジルアルコールを用いた。その結果、 $m/z$  345 (M+H)<sup>+</sup> のピークを検出した。第 5 図に、国産菊花クロロホルム抽出画分 A-a-2 の MS スペクトルを示す。第 5 図において、横軸は  $m/z$  値、縦軸は相対強度を示す。

(4) 実施例 19-(1) で調製し、実施例 19-(2) で活性を確認した国産菊花クロロホルム抽出画分 A-a-2 を核磁気共鳴 (NMR) スペクトル装置 (JNM-A500: 日本電子社製) を用い各種スペクトルを測定し構造解析した。以下に NMR の帰属の信号を示した。

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  1.42(3H, d, J=7.0 Hz, 14-H), 1.85(1H, dt, J=14.0, 2.5 Hz, 9-H), 1.88(3H, t, J=1.5 Hz, 5'-H), 1.94(1H, t, J=5.5 Hz, 1-H), 2.00(3H, dd, J=1.5, 7.0 Hz, 4'-H), 2.10(1H, d, J=14.0 Hz, 9-H), 2.17(1H, m, 10-H), 2.29(3H, s, 15-H), 2.96(1H, dd, J=5.5, 10.0 Hz, 5-H), 3.11(1H, tt, J=3.0, 10.0 Hz, 7-H), 3.96(1H, t, J=10.0 Hz, 6-H), 5.25(1H, dt, J=2.5, 10.0 Hz, 8-H), 5.63(1H, d, J=3.0 Hz, 13-H), 5.94(1H, brs, 3-H), 6.18(1H, d, J=3.0 Hz, 13-H), 6.22(1H, dq, J=1.5, 7.0 Hz, 3'-H)

但し、サンプルは重クロロホルムに溶解し、残留クロロホルムの化学シフト値を7.24 ppmとして表した。第6図に、国産菊花クロロホルム抽出画分A-a-2の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。第6図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

(5) 実施例19-(1)で調製し、実施例19-(2)で活性を確認した国産菊花クロロホルム抽出画分A-a-2について行ったマススペクトル、NMRスペクトル解析の結果、活性成分がグアイアノライド(2-Oxo-8-angeloyloxy-guaia-3(4),11(13)-dien-12,6-olide(分子量344))であることが確定した。

#### 実施例20

(1) 実施例18-(1)で得た国産菊花クロロホルム抽出画分A-bをクロロホルム：メタノール = 100：1を展開溶媒とする薄層クロマトに供した。R<sub>f</sub>値0.43～0.57の部分をかきとり、展開溶媒で再溶出して国産菊花クロロホルム抽出画分A-b-1を得た。

(2) 実施例20-(1)で得た画分A-b-1のNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。画分A-b-1は0.025、0.05 mg/mlとなるように添加した。その結果を表31に示した。画分A-b-1は濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表31

国産菊花クロロホルム抽出画分A-b-1濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
0	100
0.025	183.4
0.05	1053.3

(ただし、ネガティブコントロールのNGF産生量は0.183 ng/mlであった。)

(3) 実施例20-(1)で調製し、実施例20-(2)で活性を確認した国

産菊花クロロホルム抽出画分A-b-1 の質量スペクトル(MS)を質量分析計(DX302:日本電子社製)により解析した。マトリックスにはニトロメチルベンジルアルコールを用いた。その結果、 $m/z$  345 ( $M+H$ )<sup>+</sup> のピークを検出した。第7図に、国産菊花クロロホルム抽出画分A-b-1 のMSスペクトルを示す。第7図において、横軸は $m/z$  値、縦軸は相対強度を示す。

(4) 実施例20-(1)で調製し、実施例20-(2)で活性を確認した国産菊花クロロホルム抽出画分A-b-1 を赤外線吸収(IR)スペクトル(FTIR-8200PC:島津製作所社製)により構造解析した。その結果、 $1716.5\text{ cm}^{-1}$ 、 $1774.4\text{ cm}^{-1}$ の吸収を検出した。第8図に、国産菊花クロロホルム抽出画分A-b-1 のIRスペクトルを示す。第8図において、横軸は赤外線波長の逆数、縦軸は透過率を示す。

(5) 実施例20-(1)で調製し、実施例20-(2)で活性を確認した国産菊花クロロホルム抽出画分A-b-1 を<sup>1</sup>H-核磁気共鳴(NMR)スペクトル(JNM-A500:日本電子社製)により構造解析した。

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  1.66(3H, s, H-15), 1.74(3H, d, 1.0 Hz, H-14), 1.88(3H, t,  $J_{3,4} = 1.5\text{ Hz}$ ,  $J_{4,5} = 1.5\text{ Hz}$ , H-5'), 2.0(3H, dd,  $J_{3,4} = 7.5\text{ Hz}$ , H-4'), 2.26(1H, dd,  $J_{a,b} = 13.5\text{ Hz}$ ,  $J_{8,9} = 2.0\text{ Hz}$ , H-9), 2.45 - 2.5(2H, m, H-2, H-9), 2.72(1H, d,  $J_{a,b} = 17.0\text{ Hz}$ , H-2), 3.09(1H, d,  $J_{5,6} = 10.0\text{ Hz}$ , H-5), 3.18(1H, ddd,  $J_{6,7} = 10.0\text{ Hz}$ ,  $J_{7,8} = 10.5\text{ Hz}$ ,  $J_{7,13} = 3.0\text{ Hz}$ , H-7), 3.4(1H, s, H-3), 3.71(1H, t, H-6), 4.92(1H, dd, H-8), 5.52(1H, d, H-13), 6.13(1H, d, H-13), 6.18(1H, qd, H-3')

但し、サンプルは重クロロホルムに溶解し、残留クロロホルムの化学シフト値を7.24 ppmとして表した。第9図に、国産菊花クロロホルム抽出画分A-b-1 の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。第9図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

(6) 実施例20-(1)で調製し、実施例20-(2)で活性を確認した国産菊花クロロホルム抽出画分A-b-1 を<sup>13</sup>C-核磁気共鳴(NMR)スペクトル(JNM-A500

0 : 日本電子社製) により構造解析した。

$^{13}\text{C}$ -NMR :  $\delta$  15.87(C-4'), 18.88(C-15), 20.45(C-5'), 22.06(C-14), 33.18(C-2), 41.45(C-9), 51.39(C-5), 56.59(C-7), 64.33(C-3), 66.78(C-4), 69.64(C-8), 77.93(C-6), 120.62(C-13), 128.0(C-2'), 128.61(C-1), 136.41(C-10), 136.95(C-11), 140.13(C-3'), 167.0(C-1'), 169.0(C-12)

但し、サンプルは重クロロホルムに溶解し、重クロロホルムの化学シフト値を 77.93 ppm として表した。第 10 図に、国産菊花クロロホルム抽出画分 A-b-1 の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを示す。第 10 図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

(7) 実施例 20 - (1) で調製し、実施例 20 - (2) で活性を確認した国産菊花クロロホルム抽出画分 A-b-1 について行ったマススペクトル、IR スペクトル、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトル、 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル解析の結果、活性成分がグアイアノライド (3,4-Epoxy-8-angeloyloxy-guaia-1(10),11(13)-dien-12,6-olide (分子量 344)) であることが確定した。

## 実施例 21

(1) 実施例 18 - (1) で調製した国産菊花クロロホルム抽出画分 A-c をクロロホルム : 酢酸エチル = 10 : 1 を展開溶媒とする薄層クロマトに供した。Rf 値 0.33~0.42 の部分をかきとり、展開溶媒で再溶出して国産菊花クロロホルム抽出画分 A-c-1 を得た。

(2) 実施例 21 - (1) で調製した画分 A-c-1 の NGF 産生増強活性を実施例 13 と同様の方法で測定した。画分 A-c-1 は 0.25、0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加した。その結果を表 32 に示した。画分 A-c-1 は濃度依存的に L-M 細胞の NGF 産生を増強した。



表 3 2

国産菊花クロロホルム抽出画分 A-c-1 濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
0	100
0.25	150.8
0.5	434.4

(ただし、コントロールの NGF 産生量は 0.575 ng/ml であった。)

### 実施例 2 2

(1) 実施例 1 8-(1) で得た国産菊花クロロホルム抽出画分 A-d をさらにシリカクロマトに供し酢酸エチル: ヘキサン=1:3 (600 ml)、1:2 (600 ml) の順に段階的に溶出し、1 フラクション 6 ml ずつ分取した。得られたフラクション 1~43 を減圧濃縮し国産菊花クロロホルム抽出画分 A-d-1 を得た。得られたフラクション 44~73 を減圧濃縮し国産菊花クロロホルム抽出画分 A-d-2 を得た。得られたフラクション 74~80 を減圧濃縮し国産菊花クロロホルム抽出画分 A-d-3 を得た。得られたフラクション 124~140 と続いてメタノール (400 ml) を展開溶媒として得られた溶出物を合わせたものを減圧濃縮し国産菊花クロロホルム抽出画分 A-d-4 を得た。

(2) 実施例 2 2-(1) で調製した画分 A-d-1、画分 A-d-2、画分 A-d-3、画分 A-d-4 の NGF 産生増強活性を実施例 1 3 と同様の方法で測定した。画分 A-d-1 は 2.0 mg/ml となるように添加した。画分 A-d-2 は 0.5、1.0 mg/ml となるように添加した。画分 A-d-3 は 0.25、0.5 mg/ml となるように添加した。画分 A-d-4 は 0.5、1.0 mg/ml となるように添加した。その結果を表 3 3、3 4 に示した。画分 A-d-1、画分 A-d-2、画分 A-d-3、画分 A-d-4 画分は、濃度依存的に L-M 細胞の NGF 産生を増強した。

表 3 3

試料	濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
国産菊花クロロホルム抽出画分 A-d-1	0 2. 0	1 0 0 3 7 1. 9
国産菊花クロロホルム抽出画分 A-d-2	0 0. 5 1. 0	1 0 0 1 1 9. 3 4 4 0. 3
国産菊花クロロホルム抽出画分 A-d-3	0 0. 2 5 0. 5	1 0 0 1 5 6. 6 6 8 7. 2

(ただし、コントロールの NGF 産生量は 0.183 ng/ml であった。)

表 3 4

国産菊花クロロホルム抽出画分 A-d-4 濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
0	1 0 0
0. 5	1 8 2. 1
1. 0	6 4 0. 3

(ただし、コントロールの NGF 産生量は 0.107 ng/ml であった。)

### 実施例 2 3

(1) 実施例 1 7 - (2) で調製した国産菊花クロロホルム抽出画分 B をシリカクロマトに供しクロロホルム : メタノール = 20 : 1 (600 ml) を展開溶媒として溶出し、1 フラクシオン 6 ml ずつ分取した。得られたフラクシオン 15~29 を減圧濃縮し国産菊花クロロホルム抽出画分 B-a を得た。

調製した B-a 画分の NGF 産生増強活性を実施例 1 3 と同様の方法で測定した。B-a 画分は 1.0 mg/ml となるように添加した。その結果を表 3 5 に示した。B-a 画分は、L-M 細胞の NGF 産生を増強した。

表 3 5

国産菊花クロロホルム抽出画分B-a濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
0	100
1.0	358.0

(ただし、ネガティブコントロールのNGF産生量は0.280 ng/mlであった。)

#### 実施例 2 4

(1) 実施例 1 6 で調製したクロロホルム抽出残渣に8000 ml のエタノールを加え室温でエタノール抽出をおこない、菊花エタノール抽出液とエタノール抽出残渣に分画した。菊花エタノール抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮し、菊花エタノール抽出物を調製した。

(2) 実施例 2 4 - (1) で調製した菊花エタノール抽出物をシリカクロマトに供しクロロホルム：メタノール = 9 : 1 (600 ml) を展開溶媒として溶出し、1 フラクション6 ml ずつ分取した。得られたフラクション15~22を減圧濃縮し国産菊花エタノール抽出画分C を得た。次にメタノール (400 ml) を展開溶媒として溶出し、得られた溶出物を減圧濃縮し国産菊花エタノール抽出画分D を得た。

(3) 実施例 2 4 - (2) で調製したC 画分、D 画分のNGF 産生増強活性を実施例 1 3 と同様の方法で測定した。C 画分は1.0mg/mlとなるように添加した。D 画分は2.0 mg/ml となるように添加した。その結果を表 3 6 に示した。C 画分、D 画分はL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 3 6

試料	濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
国産菊花クロロホルム抽出画分 C	0 1. 0	1 0 0 1 1 2 0. 1
国産菊花クロロホルム抽出画分 D	0 2. 0	1 0 0 4 5 5. 9

(ただし、ネガティブコントロールの NGF 産生量は 0.107 ng/ml であった。)

### 実施例 2 5

中国産菊花（中国、大連市のローカルマーケットにて入手）20g を凍結乾燥後、細断したものに 500ml のクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固しクロロホルム抽出画分を得た。つぎに、残渣に 500ml のエタノールを加え室温で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分を得た。つぎに、残渣に 300ml の蒸留水を加え 60 度で 2 時間抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分に 2.5 倍量のエタノールを加え、マイナス 30 度で 2 時間静置した。その後、10,000 G の遠心で沈殿物と液体部分に分画した。液体部分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固し水抽出画分-1 を得た。一方、沈殿物は、再び蒸留水に溶解し水抽出画分-2 を得た。このようにして調製した各画分の NGF 産生増強活性を実施例 1 3 と同様の方法で測定した。菊花クロロホルム抽出画分は 0.114、0.227、0.454mg/ml となるように添加した。菊花エタノール抽出画分は 0.241、0.481、0.962mg/ml となるように添加した。菊花水抽出画分-1 は 8.88、17.8、35.5mg/ml となるように添加した。菊花水抽出画分-2 は 0.02、0.04mg/ml となるように添加した。その結果、菊花クロロホルム抽出画分、エタノール抽出画分、水抽出画分-1 および 2 は、濃度依存的に L-M 細胞の NGF 産生を増強した。それらの結果を表 3 7 に示す。

表 3 7

試料	濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
中国産菊花クロロホルム抽出画分	0	1 0 0
	0. 1 1 4	1 6 8. 2
	0. 2 2 7	2 9 7. 1
	0. 4 5 4	9 1 2. 5
中国産菊花エタノール抽出画分	0	1 0 0
	0. 2 4 1	3 2 6. 5
	0. 4 8 1	4 5 0. 1
	0. 9 6 2	5 8 2. 5
中国産菊花水抽出画分-1	0	1 0 0
	8. 8 8	2 6 4. 1
	1 7. 8	2 6 1. 8
	3 5. 5	2 2 9. 1
中国産菊花水抽出画分-2	0	1 0 0
	0. 0 2	1 3 5. 0
	0. 0 4	1 8 7. 3

(ただし、コントロールのNGF産生量は0. 5 1 6 ng/mlであった。)

#### 実施例 2 6

乾燥アシタバ (*Angelica keiskei koidz.*) 茎葉部 (阪本漢方堂社製) 20g を細断したものに600ml のクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。液体部分を除いた残渣に600ml のエタノールを加え室温で抽出をおこなった。液体部分を除いた残渣に360ml の蒸留水を加え60度で2 時間抽出をおこなった。固形残渣を除いた液体部分に2.5 倍量のエタノールを加え、マイナス30度で2 時間静置した。その後、10,000Gの遠心で沈殿物と液体部分に分画した。液体部分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固しアシタバ茎葉部水抽出画分-1を得た。一方、沈殿物は、再び蒸留水に溶解しアシタバ茎葉部水抽出画分-2を得た。このようにして調製したアシタバ茎葉部水抽出画分-1および2のNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。アシタバ茎葉部水抽出画分-1は2.59、5.19mg/ml となるように添加した。アシタバ茎葉部水抽出画分-2は0.35、0.7mg/mlとなるように添加した。その結果、アシタバ茎葉部水抽出画分-1および2は

、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。それらの結果を表38に示す。

表 3 8

試料	濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
アシタバ茎葉部水抽出画分-1	0	100
	2.59	475.2
	5.19	644.9
アシタバ茎葉部水抽出画分-2	0	100
	0.35	149.3
	0.70	186.7

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.553 ng/mlであった。)

#### 実施例 2 7

乾燥アシタバ根部(韓国にて採取)20gを細断したものに300mlのクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固しクロロホルム抽出画分を得た。つぎに、残渣に300mlのエタノールを加え室温で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分を得た。つぎに、残渣に150mlの蒸留水を加え60度で2時間抽出をおこなった。固形残渣を除いた液体部分に2.5倍量のエタノールを加え、マイナス30度で2時間静置した。その後、10,000Gの遠心で沈殿物と液体部分に分画した。液体部分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固しアシタバ根部水抽出画分-1を得た。一方、沈殿物は、再び蒸留水に溶解しアシタバ根部水抽出画分-2を得た。このようにして調製した各画分のNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。アシタバ根部クロロホルム抽出画分は0.03mg/mlとなるように添加した。アシタバ根部エタノール抽出画分は0.275、0.55、1.1mg/mlとなるように添加した。アシタバ根部水抽出画分-1は4.15、8.3、16.6mg/mlとなるように添加した。アシタバ根部水抽出画分-

2は0.55、1.1mg/mlとなるように添加した。その結果、アシタバ根部クロロホルム抽出画分、アシタバ根部エタノール抽出画分、アシタバ根部水抽出画分-1および2はL-M細胞のNGF産生を増強した。それらの結果を表39に示す。

表 3 9

試料	濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
アシタバ根部クロロホルム抽出画分	0	100
	0.03	198.4
アシタバ根部エタノール抽出画分	0	100
	0.275	185.8
	0.550	254.9
	1.10	305.7
アシタバ根部水抽出画分-1	0	100
	4.15	350.8
	8.30	496.7
	16.6	830.3
アシタバ根部水抽出画分-2	0	100
	0.55	174.6
	1.10	242.3

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.473 ng/mlであった。)

#### 実施例 2 8

(1) アシタバ根部(韓国にて採取)の凍結乾燥品600 gを細断し、18,000 mlのクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。クロロホルム抽出液をろ過で除いた残渣に18,000 mlのエタノールを加え室温で抽出をおこなった。エタノール抽出液をろ過で除いた残渣に4,000 mlの蒸留水を加え60度で2時間抽出をおこなった。固形残渣を除いた液体部分に2.5倍量のエタノールを加え、マイナス30度で2時間静置した。その後、10,000Gの遠心で沈殿物を除き、液体部分をロータリーエバポレーターで200 mlにまで濃縮した。濃縮液をアンバーライトXAD-2(オレガノ社製:樹脂量400 ml)に供し、蒸留水2,000 mlで非吸着物を十分に洗いだし、次に、2,000 mlのメタノールで吸着物を溶出した。メタノール溶出液を

ロータリーエバポレーターで濃縮し、アシタバ根部水抽出低分子XAD-2 処理物を得た。

(2) 実施例 28-(1) で調製したアシタバ根部水抽出低分子XAD-2 処理物の活性成分を逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。以下にその条件について示す。カラムはTSK gel ODS-80Ts (径21.5mm X長30cm: 東ソー社製) を用いた。溶媒A (蒸留水) と溶媒B (蒸留水とアセトニトリルを容量比1 対1 で混合したもの) の溶出比は0 分から120 分にかけて溶媒B比を直線的に0 %から100 %に、続く20分間は溶媒B比を100 %に保持、最後に溶媒B比を0 %にし20分間保持とした。溶出速度は5ml/分、検出は215nm で行った。8 分ごとにフラクションを採取し、各フラクションの活性を実施例 13 と同様の方法で行った。その結果、21.0、22.8、23.6、26.7、34.8、42.4、47.8、51.5、51.7、51.9、52.1、52.2、53.8、55.6、56.2、56.6、56.7、58.1、61.5、68.6、71.4、79.7、84.9、85.8、89.7、101.5、104.5、120.9、124.7分の検出のピークを含むフラクションに、NGF 産生増強活性があることが明らかになった。表 40 にその結果を示す。

表 40

分画フラクション (検出ピーク: 分)	濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
1 (21.0、22.8、23.6)	2. 5 0	4 4 1. 3
2 (26.7)	2. 5 0	3 7 9. 8
3 (34.8)	2. 5 0	2 0 0. 3
4 (42.4)	2. 8 4	4 5 3. 3
5 (47.8)	3. 4 7	3 8 5. 8
6 (51.5、51.7、51.9、52.1、52.2、53.8)	1. 4 8	4 0 9. 9
7 (55.6、56.2、56.6、56.7、58.1、61.5)	1. 2 4	2 6 8. 4
8 (68.6)	0. 9 6 5	2 9 9. 7
9 (79.7)	1. 1 6	1 1 0 4. 5
10 (84.9、85.8、89.7)	1. 2 5	1 1 9 6. 4
11 (101.5、104.5)	3. 1 7	2 6 7. 9
12 (120.9、124.7)	5. 2 8	2 7 7. 5

(ただし、コントロールのNGF 産生量は、0.210 ng/ml であった。)



(3) アシタバ根部水抽出低分子XAD-2 処理物の活性成分をゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分画した。以下にその条件について示す。カラム樹脂はトヨパールHW-40C (樹脂量2000 ml : 東ソー社製) を用いた。溶媒は蒸留水を用いた。乾燥重量にして1.0 g 分のアシタバ根部水抽出低分子XAD-2 処理物濃縮液を供し、10 ml ごとにフラクションを採取した。各フラクションのNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で行った。各フラクション試料は10倍濃縮後、培地の10分の1 となるよう添加した。その結果、多くのフラクションにNGF産生増強活性が確認された。

(4) 実施例28-(3) で活性が確認されたフラクションの一部のフラクション69~79を集め濃縮したものを逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。以下にその条件について示す。カラムはTSK gel ODS-80Ts (径21.5mm X長30cm : 東ソー社製) を用いた。溶媒A (0.1 %トリフルオロ酢酸水溶液) と溶媒B (蒸留水とアセトニトリルを容量比1 対1 で混合したもので0.1 %トリフルオロ酢酸を含む) の溶出比は0 分から60分にかけて溶媒B比を直線的に25%から100 %に、続く10分間は溶媒B比を100 %に保持、最後に溶媒B比を25%にし10分間保持とした。溶出速度は5 ml/ 分、検出は215 nmで行った。採取したフラクションのNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で行った。その結果、保持時間0 ~ 22.5分、22.5~25分、25~31.5分、31.5~32.5分、32.5~37分、37~43.5分、43.5~47分、47~50.5分、50.5~77分、77~78.5分、78.5~81.5分のフラクションにNGF産生増強活性があることが明らかになった。表41にその結果を示す。

表 4 1

フラクション (保持時間 : 分)	濃度 (mg/ml )	NGF 産生量 (%)
1 (0 ~22.5)	9.60	415.02
2 (22.5~25)	0.175	172.10
3 (25~31.5)	7.00	854.94
4 (22.5~25)	0.30	149.79
5 (31.5~32.5)	0.50	153.65
6 (32.5~37)	1.70	272.96
7 (37~43.5)	1.50	369.96
8 (43.5~47)	0.475	190.99
9 (47~50.5)	2.90	507.30
10 (50.5~77)	0.70	179.83
11 (78.5~81.5)	0.15	166.52

(ただし、コントロールのNGF産生量は、0.143 ng/ml であった。)

(5) 実施例 28 - (4) で強い活性が確認された保持時間25~31.5分のフラクションを逆相クロマトグラフィーを用いてさらに分画した。以下にその条件について示す。カラムはTSK-GEL Carbon-500 (径4.6 mm X長10 cm : 東ソー社製) を用いた。溶媒A (蒸留水) と溶媒B (蒸留水とアセトニトリルを容量比1 対1 で混合したもの) の溶出比は0 分から15分にかけて溶媒B比を直線的に25%から45%に、続く10分間は溶媒B比を45%に保持、最後に溶媒B比を25%にし5 分間保持とした。溶出速度は1ml/分、検出は215nm で行った。その結果、7.82分と11.09 分のそれぞれのピークを含む二つのフラクションに分画することができた。

(6) 実施例 28 - (5) においてTSK-GEL Carbon-500クロマトグラフィーで分画された7.82分のピークを含むフラクションの質量スペクトル( MS) を質量分析計(DX302 : 日本電子社製) により解析した。マトリックスにはグリセロールを用いた。その結果、m/z 131、185、223、321 のピークを検出した。第 11 図に質量スペクトルを示す。第 11 図において、横軸はm/z 値、縦軸は相対強度を示す。

(7) 実施例 28 - (5) においてTSK-GEL Carbon-500クロマトグラフィーで分画された7.82分のピークを含むフラクションを赤外線吸収(IR)スペクトル(FTI

R-8200PC : 島津製作所社製) により構造解析した。第 1 2 図にIRスペクトルを示す。第 1 2 図において、横軸は赤外線波長の逆数、縦軸は透過率を示す。

( 8 ) 実施例 2 8 - ( 5 ) においてTSK-GEL Carbon-500クロマトグラフィーで分画された7.82分のピークを含むフラクションを $^1\text{H}$ -核磁気共鳴(NMR) スペクトル(JNM-A500 : 日本電子社製) により構造解析した。サンプルは重水に溶解した。第 1 3 図に $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す。第 1 3 図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

( 9 ) 実施例 2 8 - ( 5 ) においてTSK-GEL Carbon-500クロマトグラフィーで分画された7.82分のピークを含むフラクションを $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴(NMR) スペクトル(JNM-A500 : 日本電子社製) により構造解析した。サンプルは重水に溶解した。第 1 4 図に $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを示す。第 1 4 図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

( 1 0 ) 実施例 2 8 - ( 5 ) においてTSK-GEL Carbon-500クロマトグラフィーで分画された11.09 分のピークを含むフラクションの質量スペクトル( MS ) を質量分析計(DX302 : 日本電子社製) により解析した。マトリックスにはグリセロールを用いた。その結果、 $m/z$  131 、185 、223 、321 のピークを検出した。第 1 5 図に質量スペクトルを示す。第 1 5 図において、横軸は $m/z$  値、縦軸は相対強度を示す。

( 1 1 ) 実施例 2 8 - ( 5 ) においてTSK-GEL Carbon-500クロマトグラフィーで分画された11.09 分のピークを含むフラクションを赤外線吸収(IR)スペクトル(FTIR-8200PC : 島津製作所社製) により構造解析した。第 1 6 図にIRスペクトルを示す。第 1 6 図において、横軸は赤外線波長の逆数、縦軸は透過率を示す。

( 1 2 ) 実施例 2 8 - ( 5 ) においてTSK-GEL Carbon-500クロマトグラフィーで分画された11.09 分のピークを含むフラクションを $^1\text{H}$ -核磁気共鳴(NMR) スペクトル(JNM-A500 : 日本電子社製) により構造解析した。サンプルは重水に溶解した。第 1 7 図に $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す。第 1 7 図において、横軸は化学シフト

ト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

(13) 実施例28-(5)においてTSK-GEL Carbon-500クロマトグラフィーで分画された11.09分のピークを含むフラクションを $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴(NMR)スペクトル(JNM-A500:日本電子社製)により構造解析した。サンプルは重水に溶解した。第18図にピークを含むフラクションの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す。第18図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

## 実施例29

(1) アシタバ乾燥品(阪本漢方堂社製)480gをフードプロセッサで粉砕し、酢酸エチル約1Lで2回抽出し、得られた有機層画分を減圧濃縮した後、濃縮物をシリカクロマトに供した。吸着物をクロロホルム:メタノール=100:1(600mL)、12:1(600mL)の順に段階的に溶出し、1フラクションに8mLずつ分取した。得られたフラクション76以降を集めて減圧濃縮し、濃縮物をヘキサン:酢酸エチル=1.8:1を展開溶媒としたシリカクロマトに供することによりフラクション25~50にキサントアンゲロールを高濃度に含む画分を得た。この画分から、酢酸エチルとヘキサンにより再結晶することで、高純度のキサントアンゲロール約200mgを得た。NMRスペクトルの測定結果を以下に示す。

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  1.58 (3H, s, -Me), 1.66 (3H, s, -Me), 1.81 (3H, s, -Me), 2.08 (4H, m), 3.48 (2H, d, J 7Hz), 5.04 (1H, m), 5.29 (1H, m), 6.40 (1H, d,  $J_{5,6}$  9 Hz, H-5'), 6.86 (2H, d,  $J_{5,6}$  9,  $J_{2,3}$  9 Hz, H-2, 6), 7.45 (1H, d,  $J_{\alpha,\beta}$  15 Hz, H- $\alpha$ ), 7.54 (2H, d, H-3, 5), 7.71 (1H, d, H-6'), 7.82 (1H, d, H- $\beta$ )

但し、サンプルは重クロロホルムに溶解し、残留クロロホルムの化学シフト値を2.49 ppmとして表した。

(2) 実施例29-(1)で調製したキサントアンゲロールのNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。キサントアンゲロールは25、50、

100  $\mu$ Mとなるように添加した。その結果を表42に示した。キサントアンゲロールはL-M細胞のNGF産生を増強した。

表42

キサントアンゲロール濃度 ( $\mu$ M)	NGF産生量 (%)
25	126.1
50	202.6
100	265.7

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.199 ng/mlであった。)

### 実施例30

(1) 乾燥アシタバ根部粉末5.8 kgに24リットルの酢酸エチルを加え室温で3時間、抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に18リットルのエタノールを加え室温で一晩抽出をおこなった。つぎに、吸引ろ過後の残渣に52リットルの蒸留水を加え60度で3時間抽出をおこなった。固形残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮したものに2.5倍量のエタノールを加え、4℃で一晩静置した。その後、吸引ろ過で沈殿物と液体部分に分画した。液体部分を、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固しアシタバ根部水抽出低分子画分を得た。つぎにアシタバ根部水抽出低分子画分をアンバーライトXAD-2 (オレガノ社製：樹脂量2リットル) に供し、蒸留水30リットルで非吸着物を十分に洗いだし、次に、16リットルのメタノールで吸着物を溶出した。メタノール溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、アシタバ根部水抽出低分子XAD-2画分処理物を得た。

(2) 実施例30-(1)記載の上記アシタバ根部水抽出低分子画分XAD-2処理物のNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。アシタバ根部水抽出低分子画分XAD-2処理物は0.85、1.7、3.4 mg/mlとなるように添加した。表43に示すように、アシタバ根部水抽出低分子画分XAD-2処理物は、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 4 3

試料濃度 (mg/ml )	0	0.85	1.7	3.4
NGF(%)	100	655.3	858.8	1127.6

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.074 ng/ml であった。)

(3) 実施例 30 - (1) 記載のアシタバ根部水抽出低分子画分XAD-2 処理物の活性成分を逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。以下にその条件について示す。樹脂はコスモシール 140 C18-OPN (ナカライテスク社製 : 樹脂量400 ml) を用いた。アシタバ根部水抽出低分子画分XAD-2 処理物を供し、展開溶媒としてそれぞれ1 リットルの蒸留水、20%アセトニトリル水溶液、25%アセトニトリル水溶液、40% アセトニトリル水溶液、メタノールの順に溶出を行い、各溶出画分を減圧濃縮し、各コスモシール分画物を調製した。

(4) 実施例 30 - (3) 記載のコスモシール 140 クロマトグラフィー分画物のNGF 産生増強活性を実施例 13 と同様の方法で測定した。その結果、20%アセトニトリル水溶液溶出画分、25%アセトニトリル水溶液溶出画分、40% アセトニトリル水溶液溶出画分にNGF 産生増強活性があることが明らかになった。表 4 4 にその結果を示す。

表 4 4

画分	試料濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
20%アセトニトリル水溶液溶出画分	0	100
	4.05	301.0
	8.1	436.7
	16.2	1263.3
25%アセトニトリル水溶液溶出画分	0.7	161.7
	1.5	1028.8
	2.8	2110.4
40%アセトニトリル水溶液溶出画分	0.575	465.3
	1.15	653.1
	2.3	1226.2

(ただし、コントロールのNGF産生量は、20%アセトニトリル水溶液溶出画分が0.074、25%、40%アセトニトリル水溶液溶出画分が0.087 ng/mlであった。)

(5) 実施例30-(3)記載のコスモシール140の25%アセトニトリル水溶液溶出画分の活性成分を逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。

以下にその条件について示す。カラムはTSK gel ODS-80Ts (21.5mm X 30cm: 東ソー社製)を用いた。溶媒A(蒸留水)と溶媒B(蒸留水とアセトニトリルを容量比1対1で混合したもの)の溶出比は、0分から120分にかけて溶媒B比を直線的に25%から100%に、続く20分間は溶媒B比を100%に保持、最後に溶媒B比を25%にし、20分間保持とした。溶出速度は5ml/分、検出は235nmで行った。紫外線吸収を指標にフラクションを採取した。

(6) 実施例30-(5)記載のコスモシール25%アセトニトリル水溶液溶出画分のODS-80Tsクロマトグラフィー分画物の活性を実施例13と同様の方法で行った。その結果、多くのフラクションに、NGF産生増強活性があることが明らかになった。表45にその結果を示す。

表 4 5

分画フラクション (検出ピーク：分)	濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
1 (46.0、47.2、49.0)	2. 0 0	2 5 0. 8
2 (53.2)	2. 0 0	2 7 5. 2
3 (54.0)	2. 0 0	3 1 8. 7
4 (54.9、55.5、56.4)	2. 0 0	2 9 3. 0
5 (57.6)	2. 0 0	3 2 0. 5
6 (58.6)	2. 0 0	2 9 7. 8
7 (59.3)	2. 0 0	3 2 4. 8
8 (60.5)	2. 0 0	3 2 4. 8
9 (61.3)	2. 0 0	4 0 2. 8
1 0 (62.2)	2. 0 0	5 6 5. 5
1 1 (63.0)	2. 0 0	6 1 6. 9
1 2 (64.1)	2. 0 0	5 7 5. 4
1 3 (66.9)	2. 0 0	8 0 5. 3
1 4 (68.4)	2. 0 0	8 1 9. 6
1 5 (69.2)	2. 0 0	5 1 0. 2
1 6 (70.3)	1. 0 0	3 8 9. 2
1 7 (71.3、71.9)	1. 0 0	6 0 9. 1
1 8 (73.0、73.8、74.9)	0. 5 0	1 0 0 2. 5
1 9 (75.4)	0. 5 0	8 5 1. 3
2 0 (76.5)	1. 0 0	8 3 8. 5
2 1 (77.7)	1. 0 0	2 4 9. 4
2 2 (79.6、80.5)	0. 5 0	2 3 4. 3
2 3 (82.4)	0. 2 5	3 5 9. 1
2 4 (84.1)	0. 2 5	2 8 5. 8
2 5 (85.5)	0. 0 6 2 5	3 5 9. 1
2 6 (86.9、87.5)	0. 1 0	4 1 1. 6
2 7 (89.1)	0. 5 0	4 4 3. 3
2 8 (91.4)	0. 0 5	1 0 5 8. 1
2 9 (92.8)	0. 2 0	6 7 2. 0
3 0 (93.8、95.8、97.5、100.0、100.6)	0. 5 0	5 9 3. 6

(ただし、コントロールのNGF産生量は、フラクション1～9は0.355、フラクション10～18は0.382、フラクション19～27は0.415、フラクション28～30は0.450 ng/mlであった。)

(7) 実施例30-(6)で活性を確認したアシタバ根部由来フラクション10(保持時間62.2分の検出のピークを含むフラクション)の質量スペクトル(MS)を質量分析計(DX302:日本電子社製)によりFAB-MSの手法で測定した。マトリックスにはグリセロールを用いた。その結果、 $m/z$  245(M-OGlc)<sup>+</sup>のピークを検出した。第19図に、アシタバ根部由来フラクション10のFAB-MS



スペクトルを示す。第19図において、横軸は $m/z$  値、縦軸は相対強度を示す。

アシタバ根部由来フラクション10を核磁気共鳴(NMR) スペクトル装置(JNM-A500 : 日本電子社製) を用い各種NMRスペクトルを測定し構造解析した。以下にNMRの帰属の信号を示した。

$^1\text{H-NMR}$  :  $\delta$  1.36(3H, s,  $2' - \text{CH}_3$ ), 1.37(3H, s,  $2' - \text{CH}_3$ ), 3.08(2H, m,  $2' - \text{H}$  および  $4' - \text{H}$ ), 3.12(1H, m,  $3' - \text{H}$ ), 3.41(1H, m,  $5' - \text{H}$ ), 3.81(1H, d,  $J=4.5$  Hz,  $3' - \text{H}$ ), 4.11(1H, dd,  $J=7.0, 11.5$  Hz,  $6' - \text{H}$ ), 4.35, (1H, brd,  $J=11.5$  Hz,  $6' - \text{H}$ ), 4.53(1H, d,  $J=7.5$  Hz,  $1' - \text{H}$ ), 5.14(1H, d,  $J=4.5$  Hz,  $4' - \text{H}$ ), 6.28(1H, d,  $J=9.5$  Hz,  $3 - \text{H}$ ), 6.78(1H, d,  $J=8.5$  Hz,  $6 - \text{H}$ ), 7.54(1H, d,  $J=8.5$  Hz,  $5 - \text{H}$ ), 7.98(1H, d,  $J=9.5$  Hz,  $4 - \text{H}$ )

但し、以下 $^1\text{H-NMR}$ においては、サンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、残留ジメチルスルホキシドの化学シフト値を2.49 ppmとして表した。第20図に、アシタバ根部由来フラクション10の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。第20図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

アシタバ根部由来フラクション10について行ったマスマスペクトル、NMR スペクトル解析の結果、活性成分が $3' - \text{O} - \beta - \text{D} - \text{Glucopyranoyl Khellactone}$  (分子量424) であることが確定した。

(8) 実施例30-(6)で強い活性が確認されたフラクション13(保持時間66.9分の検出のピークを含むフラクション)を逆相クロマトグラフィーを用いてさらに分画した。

以下にその条件について示す。カラムはTSK gel ODS-80TsQA (4.6mm X 25cm : 東ソー社製)を用いた。溶媒A (0.1%トリフルオロ酢酸を含む蒸留水)と溶媒B (蒸留水とアセトニトリルを容量比1対1で混合したもので0.1%トリフルオロ酢酸を含む)の溶出比は20分間、溶媒B比を50%保持とした。溶出速度は1 ml/分、検出は235nmで行い、紫外線吸収を指標にフラクションを採取した。

(9) 実施例30-(8)においてTSK gel ODS-80TsQAクロマトグラフィーで

分画されたフラクションの活性を実施例 13 と同様の方法で行った。その結果、7.9、8.7、9.2、10.2、11.5、12.7、13.9 分の検出のピークを含むフラクションに、NGF 産生増強活性があることが明らかになった。表 46 にその結果を示す。

表 46

分画フラクション (検出ピーク：分)	濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
13-1 (7.9)	0.56	654.3
13-2 (8.7)	1.00	792.1
13-3 (9.2)	0.56	366.9
13-4 (9.7)	0.96	363.9
13-5 (10.2)	0.96	361.0
13-6 (11.5)	1.00	232.0
13-7 (12.7)	0.50	261.3
13-8 (13.9)	1.00	630.8

(ただし、コントロールの NGF 産生量は、0.053 ng/ml であった。)

(10) 実施例 30-(9) で活性が認められたアシタバ根部由来フラクション 13-2 の質量スペクトル、NMR スペクトルを実施例 30-(7) と同様に測定した。

質量分析により、 $m/z$  393( $M+H$ )<sup>+</sup> のピークを検出した。第 21 図に、アシタバ根部由来フラクション 13-2 の MS スペクトルを示す。第 21 図において、横軸は  $m/z$  値、縦軸は相対強度を示す。

アシタバ根部由来フラクション 13-2 を核磁気共鳴(NMR) の NMR の帰属の信号を示す。

<sup>1</sup>H-NMR :  $\delta$  1.61(3H, s, 3'-CH<sub>3</sub>), 1.78(3H, s, 3'-CH<sub>3</sub>), 3.17(1H, t, J=9.5 Hz, 4''-H), 3.28(1H, m, 3''-H), 3.29(1H, m, 2''-H), 3.38(1H, m, 5''-H), 3.40(1H, m, 1'-H), 3.46(1H, m, 6''-H), 3.58(1H, m, 1'-H), 3.69(1H, m, 6'-H), 4.94(1H, d, J=7.5 Hz, 1''-H), 5.20(1H, m, 2'-H), 6.30(1H, d, J=9.5

Hz, 3-H), 7.11(1H, d, J=8.5 Hz, 6-H), 7.51(1H, d, J=8.5 Hz, 5-H), 7.98(1H, d, J=9.5 Hz, 4-H)

第22図に、アシタバ根部由来フラクション13-2の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。第22図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

<sup>13</sup>C-NMR : δ 17.8(3'-CH<sub>3</sub>), 21.6(1'-c), 25.5(3'-CH<sub>3</sub>), 60.6(6''-c), 69.7(4''-c), 73.4(2''-c), 76.7(3''-c), 77.1(5''-c), 100.8(1''-c), 111.5(6-c), 112.8(3-c), 113.4(10-c), 117.4(8-c), 121.3(2'-c), 126.8(5-c), 131.5(3'-c), 144.5(4-c), 152.1(9-c), 157.8(7-c), 160.2(2-c)

但し、以下<sup>13</sup>C-NMRにおいてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの化学シフト値を39.5 ppmとして表した。第23図に、アシタバ根部由来フラクション13-2の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを示す。第23図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

アシタバ根部由来フラクション13-2について行ったマススペクトル、NMRスペクトル解析の結果、活性成分が7-O-β-D-Glucopyranosyloxy-8-prenylcoumarin(分子量392)であることが確定した。

(11) 実施例30-(6)で強い活性が確認されたフラクション18(保持時間73.0、73.8、74.97分の検出のピークを含むフラクション)を実施例30-(8)と同様の方法で逆相クロマトグラフィーを用いてさらに分画した。

(12) 実施例30-(11)においてTSK gel ODS-80TsQAクロマトグラフィーで分画されたフラクションの活性を実施例13と同様の方法で行った。その結果、9.3、10.1、10.6、11.2、12.0、12.8、13.3、14.0、15.2、16.1、18.6分の検出のピークを含むフラクションに、NGF産生増強活性があることが明らかになった。表47にその結果を示す。

表 4 7

分画フラクション (検出ピーク：分)	濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
18-1 (9.3)	0.20	1489.6
18-2 (10.1)	0.50	2222.9
18-3 (10.6)	0.25	3039.6
18-4 (10.9)	0.0375	2510.4
18-5 (11.2)	0.125	610.4
18-6 (12.0)	0.50	560.4
18-7 (12.8)	0.50	681.3
18-8 (13.3)	0.40	339.6
18-9 (14.0)	1.00	410.4
18-10 (15.2)	1.00	2510.7
18-11 (16.1)	1.00	3360.7
18-12 (18.6)	1.00	1189.3

(ただし、コントロールのNGF産生量は、18-1～9は0.027、18-10～12は0.015、ng/mlであった。)

(13) 実施例30-(12)で活性を確認したアシタバ根部由来フラクション18-3の質量スペクトル、NMRスペクトルを実施例30-(7)と同様に測定した。

質量分析により、 $m/z$  195(M + H)<sup>+</sup>のピークを検出した。第24図に、アシタバ根部由来フラクション18-3のMSスペクトルを示す。第24図において、横軸は $m/z$ 値、縦軸は相対強度を示す。

NMRの帰属の信号を示す。

<sup>1</sup>H-NMR :  $\delta$  3.68(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 6.25(1H, d, J = 16.0 Hz, 2'-H), 6.75(1H, d, J = 8.0 Hz, 5-H), 6.98(1H, dd, J = 2.0, 8.0 Hz, 6-H), 7.03(1H, d, J = 2.0, 2-H), 7.46(1H, d, J = 16.0 Hz, 3'-H), 9.10(1H, s, 3-OH), 9.56(1H, s, 4-OH)

第25図に、アシタバ根部由来フラクション18-3の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。第25図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

アシタバ根部由来フラクション18-3について行ったマスペクトル、NMR

スペクトル解析の結果、活性成分がコーヒー酸メチルエステル(分子量194)であることが確定した。

(14) 実施例30-(12)で活性を確認した記載のアシタバ根部由来フラクション18-4の質量スペクトル、NMRスペクトルを実施例30-(5)と同様に測定した。

質量分析により、 $m/z$  253( $M + H$ )<sup>+</sup>のピークを検出した。第26図に、アシタバ根部由来フラクション18-4のMSスペクトルを示す。第26図において、横軸は $m/z$  値、縦軸は相対強度を示す。

NMRの帰属の信号を示す。

<sup>1</sup>H-NMR :  $\delta$  1.15(3H, s, 2-CH<sub>3</sub>), 1.27(3H, s, 2-CH<sub>3</sub>), 2.39(1H, dd, J=8.0, 17.0 Hz, 4-H), 2.76(1H, dd, J=5.0, 17.0 Hz, 4-H), 3.62(1H, m, 3-H), 3.81(3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 5.16(1H, d, J=4.5 Hz, 3-OH), 6.56(1H, d, J=9.0 Hz, 6-H), 7.59(1H, d, J=9.0 Hz, 10-H), 11.86(1H, brs, 8-COOH)

第27図に、アシタバ根部由来フラクション18-4の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。第27図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

<sup>13</sup>C-NMR :  $\delta$  20.4(2-CH<sub>3</sub>), 25.4(2-CH<sub>3</sub>), 26.2(4-C), 55.7(5-OCH<sub>3</sub>), 67.0(3-C), 77.6(2-C), 101.8(6-C), 109.4(10-C), 112.5(8-C), 130.7(7-C), 153.3(9-C), 160.4(5-C), 166.6(8-COOH)

第28図に、アシタバ根部由来フラクション18-4の<sup>13</sup>C-NMR スペクトルを示す。第28図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

アシタバ根部由来フラクション18-4のマススペクトル、NMR スペクトル解析の結果、活性成分が8-Carboxyl-3-hydroxy-5-methoxyl-2-dimethylchroman(分子量252)であることが確定した。

(15) 実施例30-(6)で強い活性が確認されたフラクション19(保持

時間75.4の検出のピークを含むフラクション)、フラクション20(76.5分の検出のピークを含むフラクション)を混合し、実施例30-(8)と同様の方法で逆相クロマトグラフィーを用いてさらに分画した。

(16) 実施例30-(15)においてTSK gel ODS-80TsQAクロマトグラフィーで分画されたフラクションの活性を実施例13と同様の方法で行った。その結果、13.7、14.3、15.1、15.5、16.4、18.8、20.5分の検出のピークを含むフラクションに、NGF産生増強活性があることが明らかになった。表48にその結果を示す。

表48

分画フラクション (検出ピーク：分)	濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
19、20-1 (13.7)	0.60	192.4
19、20-2 (14.3)	1.00	246.6
19、20-3 (15.1)	1.00	372.2
19、20-4 (15.5)	0.60	529.8
19、20-5 (16.4)	1.00	487.9
19、20-6 (18.8)	1.00	337.7
19、20-7 (20.5)	0.364	305.7

(ただし、コントロールのNGF産生量は、0.063 ng/mlであった。)

(17) 実施例30-(16)で活性を確認したアシタバ根部由来フラクション19、20-5の質量スペクトル、NMRスペクトルを実施例30-(7)と同様に測定した。

質量分析で、 $m/z$  393( $M+H$ )<sup>+</sup>のピークを検出した。第29図に、アシタバ根部由来フラクション19、20-5のMSスペクトルを示す。第29図において、横軸は $m/z$ 値、縦軸は相対強度を示す。

NMRの帰属の信号を示す。

<sup>1</sup>H-NMR :  $\delta$  1.67(3H, s, 3'-CH<sub>3</sub>), 1.69(3H, s, 3'-CH<sub>3</sub>), 3.15(1H, m, 4'-H), 3.29(3H, m, 1'-H, 2'-H および 3''-H), 3.37(1H, dd, J=7.5, 15.5 Hz, -1

1'-H), 3.45(2H, m, 5'-H および 6'-H), 3.72(1H, dd, J=10.5, 6'-H), 4.97(1H, d, J=7.5 Hz, 1'-H), 5.31(1H, t, J=7.5 Hz, 2'-H), 6.28(1H, d, J=9.0 Hz, 3-H), 7.07(1H, s, 5-H), 7.41(1H, s, 8-H), 7.98(1H, d, J=9.0 Hz, 4-H)

第30図に、アシタバ根部由来フラクション19、20-5の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。第30図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

<sup>13</sup>C-NMR :  $\delta$  17.6(3'-CH<sub>3</sub>), 25.5(3'-CH<sub>3</sub>), 27.4(1'-C), 60.6(6'-C), 69.6(4'-C), 73.1(2'-C), 76.3(3''-C), 77.0(5'-C), 100.4(1''-C), 102.0(8-C), 112.8(10-C), 112.9(3-C), 121.8(2'-C), 127.4(6-C), 128.0(5-C), 132.4(3'-C), 144.4(4-C), 153.4(9-C), 157.9(7-C), 160.6(2-C)

第31図に、アシタバ根部由来フラクション19、20-5の<sup>13</sup>C-NMR スペクトルを示す。第31図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

アシタバ根部由来フラクション19、20-5について行ったマスマスペクトル、NMR スペクトル解析の結果、活性成分が7- $\beta$ -D-Glucopyranosyloxy-6-prenylcoumarin(分子量392)であることが確定した。

(18) 実施例30-(15)記載のアシタバ根部由来フラクション19、20-6の質量スペクトル、NMRスペクトルを測定した。

質量分析計で、m/z 245(M-2Glc-Angel)<sup>+</sup>、669(M+H)<sup>+</sup>、691(M+Na)<sup>+</sup>、707(M+K)<sup>+</sup>のピークを検出した。第32図に、アシタバ根部由来フラクション19、20-6のMSスペクトルを示す。第32図において、横軸はm/z 値、縦軸は相対強度を示す。

NMRの帰属の信号を示す。

<sup>1</sup>H-NMR :  $\delta$  1.36(3H, s, 2'-CH<sub>3</sub>), 1.43(3H, s, 2'-CH<sub>3</sub>), 1.79(3H, brs, 2''-CH<sub>3</sub>), 1.86(3H, brd, J=7.0 Hz, 3''-CH<sub>3</sub>), 2.90(1H, t, J=8.0 Hz, 2b-H), 2.99(1H, m, 2a-H), 3.01(1H, m, 4a-H), 3.02(1H, m, 4b-H), 3.05(1H, m, 3b-H)

H), 3.13(1H, t,  $J=9.5$  Hz, 3a-H), 3.35(1H, m, 5a-H), 3.39(1H, m, 5b-H), 3.39(1H, m, 6b-H), 3.49(1H, dd,  $J=8.0, 11.0$  Hz, 6a-H), 3.64(1H, d,  $J=11.5$  Hz, 6b-H), 4.02(1H, d,  $J=11.0$  Hz, 6a-H), 4.21(1H, d,  $J=8.0$  Hz, 1b-H), 4.37(1H, d,  $J=4.5$  Hz, 3'-H), 4.46(1H, brs, 6b-OH), 4.48(1H, d,  $J=7.5$  Hz, 1a-H), 4.51(1H, brs, 2a-OH), 4.72(1H, brs, 3b-OH), 4.83(1H, brs, 2b-OH), 4.86(1H, brs, 4a-OH), 5.03(2H, brs, 4b-OH, 3a-OH), 5.96(1H, brq,  $J=7.0$  Hz, 3''-H), 6.26(1H, d,  $J=9.5$  Hz, 3-H), 6.61(1H, d,  $J=4.5$  Hz, 4'-H), 6.83(1H, d,  $J=8.5$  Hz, 6-H), 7.59(1H, d,  $J=8.5$  Hz, 5-H), 7.96(1H, d,  $J=9.5$  Hz, 4-H)

第33図に、アシタバ根部由来フラクション19、20-6の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す。第33図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

$^{13}\text{C}$ -NMR :  $\delta$  15.2(3'-CH<sub>3</sub>), 20.0(2''-CH<sub>3</sub>), 21.3(2'-CH<sub>3</sub>), 26.4(2'-CH<sub>3</sub>), 59.1(4'-C), 61.0(6b-C), 69.2(6a-C), 70.0(glucose-C), 70.4(glucose-C), 73.4(glucose-C), 73.7(3'-C), 73.9(glucose-C), 76.1(glucose-C), 76.55(glucose-C), 76.59(glucose-C), 76.8(glucose-C), 77.8(2'-C'), 100.5(1a-C), 103.8(1b-C), 107.7(8-C), 112.1(3-C), 112.1(10-C), 114.2(6-C), 128.0(2''-C), 129.8(5-C), 136.1(3''-C), 144.5(4-C), 153.6(9-C), 156.2(7-C), 159.4(2-C), 166.3(1''-C)

第34図に、アシタバ根部由来フラクション19、20-6の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す。第34図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

アシタバ根部由来フラクション19、20-6について行ったマスマスペクトル、スペクトル解析の結果、活性成分が4'-O-Angeloyl-3'-O-[6-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-Khellactone(分子量668)であることが確定した。



(19) 実施例 30-(6) で活性を確認したアシタバ根部由来フラクション 28 (保持時間 91.4 分の検出のピークを含むフラクション) の質量スペクトル、NMR スペクトルを実施例 30-(7) と同様に測定した。

質量分析で、 $m/z$  209( $M+H$ )<sup>+</sup> のピークを検出した。第 35 図に、アシタバ根部由来フラクション 28 の MS スペクトルを示す。第 35 図において、横軸は  $m/z$  値、縦軸は相対強度を示す。

NMR の帰属の信号を示す。

<sup>1</sup>H-NMR :  $\delta$  1.23(3H, t,  $J=7.0$  Hz, 2''-H), 4.14(2H, q,  $J=7.0$  Hz, 1''-H), 6.24(1H, d,  $J=16.0$  Hz, 2'-H), 6.74(1H, d,  $J=8.0$  Hz, 5-H), 6.98(1H, dd,  $J=2.0, 8.0$  Hz, 6-H), 7.03(1H, d,  $J=2.0$  Hz, 2-H), 7.45(1H, d,  $J=16.0$  Hz, 3'-H), 9.11(1H, s, 3-OH), 9.57(1H, s, 4-OH)

第 36 図に、アシタバ根部由来フラクション 28 の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを示す。第 36 図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

アシタバ根部由来フラクション 28 について行ったマススペクトル、NMR スペクトル解析の結果、活性成分がコーヒー酸エチルエステル(分子量 208)であることが確定した。

コーヒー酸エチルエステル、コーヒー酸メチルエステルの NGF 産生増強活性を実施例 4-(1) と同様に測定した。表 49 に示すようにコーヒー酸エチルエステル、コーヒー酸メチルエステルは L-M 細胞の NGF 産生を増強した。

表 49

コーヒー酸エチルエステル ( $\mu$ g/ml)	0	62.5
NGF 産生量 (%)	100	1279.1
コーヒー酸メチルエステル ( $\mu$ g/ml)	0	62.5
NGF 産生量 (%)	100	824.4

(ただし、コントロールの NGF 産生量は 0.109 ng/ml であった。)

## 実施例 3 1

(1) タマネギの薄皮 25 g を凍結乾燥後、細断したものに 500ml のメタノールを加え室温で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固しメタノール抽出物を得た。このようにして調製したメタノール抽出物の NGF 産生増強活性を実施例 1 3 と同様の方法で測定した。タマネギ薄皮メタノール抽出物は 0.096、0.192、0.384、0.576、0.768、0.96mg/ml となるように添加した。その結果、タマネギ薄皮メタノール抽出物は、濃度依存的に L-M 細胞の NGF 産生を増強した。その結果を表 5 0 示す。

表 5 0

タマネギ薄皮メタノール抽出画分濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
0	100
0.096	140.4
0.192	136.4
0.384	200.5
0.576	277.3
0.768	307.6
0.960	349.0

(ただし、コントロールの NGF 産生量は 0.050 ng/ml であった。)

(2) イチョウ葉 (100% GINKGO BILOBA TEA : GINKGOTON 社製) 3g に蒸留水 200ml を加え 100℃ で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分を取りイチョウ葉水抽出物を得た。このようにして調製した水抽出物の NGF 産生増強活性を実施例 1 3 と同様の方法で測定した。イチョウ葉水抽出物は 0.625、1.25、2.5、5% (v/v) となるように添加した。その結果、イチョウ葉抽出物は、濃度依存的に L-M 細胞の NGF 産生を増強した。その結果を表 5 1 に示す。

表 5 1

イチョウ葉水抽出物濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
0	100
0.625	272.9
1.25	305.0
2.5	255.2
5.0	231.9

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.055 ng/mlであった。)

### 実施例 3 2

バラ花(中国のローカルマーケットにて入手)2gを細断したものに40 mlのクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。クロロホルム抽出液をろ過で除いた残渣に40 mlのエタノールを加え室温で抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分を得た。つぎに、残渣に40 mlの蒸留水を加え60度で1時間抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分に2.5倍量のエタノールを加え、マイナス30度で2時間静置した。その後、10,000Gの遠心で沈殿物と液体部分に分画した。液体部分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固し水抽出画分-1を得た。一方、沈殿物は、再び蒸留水に溶解し水抽出画分-2を得た。このようにして調製した各画分のNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。バラ花エタノール抽出画分は0.115、0.23 mg/mlとなるように添加した。水抽出画分-1は0.41、0.821 mg/mlとなるように添加した。水抽出画分-2は0.084、0.167 mg/mlとなるように添加した。その結果を表52に示した。バラ花エタノール抽出画分、水抽出画分-1、水抽出画分-2は、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 5 2

試料	濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
バラ花エタノール抽出画分	0	100
	0.115	623.5
	0.23	615.6
バラ花水抽出画分-1	0	100
	0.41	307.7
	0.821	365.9
バラ花水抽出画分-2	0	100
	0.084	195.8
	0.167	219.7

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.136 ng/mlであった。)

## 実施例 3 3

ホップ由来キサントフォームフラクション (ホップスタイナー社製) のNGF産生増強活性を実施例 1 3と同様の方法で測定した。キサントフォームフラクションは最終濃度が0.0148、0.0297、0.0594、0.119 mg/ml となるように添加した。その結果を表 5 3に示した。キサントフォームフラクションは濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 5 3

キサントフォームフラクション濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
0	100
0.0148	144.0
0.0297	242.7
0.0594	401.6
0.119	438.6

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.206 ng/mlであった。)

## 実施例 3 4

(1) 実施例 3 3にて、NGF産生促進活性が確認されたキサントフォーム

ラクシオン（ホップシュタイナー社製）0.4gをクロロホルム3 mlで溶解しシリカクロマトに供した。クロロホルム（1000 ml）、クロロホルム：メタノール＝50：1（1000 ml）、クロロホルム：メタノール＝20：1（1000 ml）の順に段階的に溶出し、1フラクションに8 mlずつ分取した。得られたフラクション67～100を減圧濃縮し、ホップ由来キサントフモールフラクションー画分Aを得た。

（2）上記キサントフモールフラクションー画分Aをさらに逆相クロマトグラフィーを用いて精製単離した。以下にその条件について示す。カラムはTSK gel ODS-80Ts（径21.5 mm X 長30 cm：東ソー社製）を用いた。溶媒A（蒸留水とアセトニトリルを容量比3 対 2で混合したもので0.1%トリフルオロ酢酸を含む）と溶媒B（蒸留水とアセトニトリルを容量比1 対 4で混合したもので0.1%トリフルオロ酢酸を含む）の溶出比は0 分から60分にかけて溶媒B比を直線的に50%から100 %に、続く20分間は溶媒B比を100 %に保持、最後に溶媒B比を50%にし20分間保持とした。溶出速度は5 ml/ 分、検出は370 nmで行い、1 分間ごとにフラクションを採取した。

（3）上記キサントフモールフラクションー画分Aの逆相クロマトフラクションのNGF 産生増強活性を実施例1 3と同様の方法で測定した。その結果、21.1、22.2、24.2、25.7、28.6分のピークを含むフラクションにNGF 産生増強活性があることが明らかになった。表5 4にその結果を示す。

表 5 4

フラクション (保持時間 : 分)	濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
A-1 (21.1)	0.025	92.4
	0.05	151.4
A-2 (22.2)	0.05	109.5
	0.1	136.2
	0.2	208.6
A-3 (24.2)	0.0125	134.3
	0.025	151.4
	0.05	202.9
	0.1	298.1
A-4 (25.7)	0.025	197.1
	0.05	345.7
	0.1	416.2
A-5 (28.6)	0.0125	145.7
	0.025	189.5
	0.05	229.5
	0.1	517.1

(ただし、コントロールのNGF産生量は、0.093 ng/ml であった。)

(4) 上記フラクションA-5 (保持時間28.6分の検出のピークを含むフラクション) の質量スペクトル (MS) を質量分析計 (DX302 : 日本電子社製) により FAB-MS の手法で測定した。マトリックスにはグリセロールを用いた。その結果、 $m/z$  371(M+H)<sup>+</sup> のピークを検出した。第37図に、キサントフモールフラクション由来のフラクションA-5のMSスペクトルを示す。第37図において、横軸は $m/z$  値、縦軸は相対強度を示す。

さらに、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル装置 (JNM-A500 : 日本電子社製) を用い各種NMRスペクトルを測定し構造解析した結果、活性成分がキサントフモール B (分子量370) とキサントフモール D (分子量370) の混合物 (混合比1 : 1.65) であることが確定した。以下にNMRの帰属の信号を示した。

キサントフモール B

<sup>1</sup>H-NMR :  $\delta$  1.21 (3H, s, 6''-H), 1.27 (3H, s, 6''-H), 2.70 (2H, m, 4''-H), 3.65 ((1H, m, 5''-H), 3.87 (3H, s, 6'-OCH<sub>3</sub>), 6.00 (1H, s, 5'-H), 6.80 (2H, m, 3-H および 5-H), 7.55 (2H, m, 2-H および 6-H), 7.70 (1H, m,  $\beta$ -H), 7.75 (1H

, m,  $\alpha$ -H), 10.12(1H, s, 4-OH), 14.18(1H, s, 2'-OH)

キサントフモール D

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  1.71(3H, s, 5''-H), 2.60(2H, m, 1''-H), 3.85(3H, s, 6'-OCH<sub>3</sub>), 4.20(1H, m, 2''-H), 4.58(1H, s, 4''-H), 4.61(1H, s, 4''-H), 6.04(1H, s, 5'-H), 6.80(2H, m, 3-Hおよび5-H), 7.55(2H, m, 2-Hおよび6-H), 7.70(1H, m,  $\beta$ -H), 7.75(1H, m,  $\alpha$ -H), 10.09(1H, s, 4-OH), 10.58(1H, s, 4'-OH), 14.69(1H, s, 2'-OH)

但し、サンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、残留ジメチルスルホキシドの化学シフト値を2.49 ppmとして表した。第38図に、キサントフモールフラクション由来のフラクションA-5の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。第38図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

(5) ホップ由来キサントフモールフラクション中の活性成分を逆相クロマトグラフィーを用いて下記のように精製単離した。

以下にその条件について示す。

カラムはTSK gel ODS-80TsQA (径4.6 mm X長25 cm : 東ソー社製) を用いた。溶媒A (蒸留水とアセトニトリルを容量比3 対1 で混合したもので0.1%トリフルオロ酢酸を含む) と溶媒B (蒸留水とアセトニトリルを容量比1 対3 で混合したもので0.1%トリフルオロ酢酸を含む) の溶出比は0 分から20分にかけて溶媒B比を直線的に50%から100 %に、続く5 分間は溶媒B比を100 %に保持、最後に溶媒B比を50%にし5 分間保持とした。溶出速度は1 ml/ 分、検出は215 nmで行った。1 分ごとにフラクションを採取し、各フラクションの活性を実施例13と同様の方法で行った。

その結果、12.8分の検出のピークを含むフラクションに、活性があることが明らかになった。このフラクションについてマススペクトル解析を行ったところ分子量が、355 のシグナルが検出された。さらに、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル解析を行ったところ、活性成分がキサントフモール (分子量354.4) であることが明らかにな

った。NMR スペクトル、質量スペクトルの測定結果は、以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$  :  $\delta$  1.60 (3H, s, -Me), 1.69 (3H, s, -Me), 3.12 (2H, d, J 7Hz, H-1" a. b ), 3.86 (3H, s, -OMe), 5.13 (1H, t, J 7Hz, H-2"), 6.07 (1H, s, H-5'), 6.83 (2H, d, J<sub>2,3</sub> 9 Hz, J<sub>5,6</sub> 9 Hz, H-2, 6), 7.56 (2 H, d, H-3, 5), 7.66 (1H, d, J a. b 16 Hz), 7.75 (1H, d), 10.05 (1H, s, OH-4), 10.55 (1H, s, OH-4'), 14.63 (1H, s, OH-2')

但し、サンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、残留ジメチルスルホキシドの化学シフト値を2.49 ppmとして表した。第39図に、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。第39図において、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

FAB-MS : m/z 355(M + H)<sup>+</sup> (但し、グリセロールをマトリックスに用いた。)

### 実施例 3 5

(1) 実施例 3 4 で得られた精製キサントフモールのNGF 産生増強活性を実施例 1 3 と同様の方法で測定した。精製キサントフモールは12.5、25、50  $\mu\text{M}$  となるように添加した。その結果を表 5 5 に示した。精製したキサントフモールはL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 5 5

キサントフモール濃度 ( $\mu\text{M}$ )	NGF産生量 (%)
0	100
12.5	235.5
25	387.9
50	443.0

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.095 ng/mlであった。)

(2) ホップ由来キサントフモールフラクション (ホップシュタイナー社製)



0.4gをクロロホルム3 mlで溶解しシリカクロマトに供した。クロロホルム (1000 ml)、クロロホルム：メタノール=50：1 (1000 ml)、クロロホルム：メタノール=20：1 (1000 ml) の順に段階的に溶出し、1フラクションに8 mlずつ分取した。得られたフラクション67～100 を減圧濃縮し、ホップ由来キサントフモールフラクション一画分Aを得た。さらに逆相クロマトグラフィーを用いてホップ由来キサントフモールフラクション一画分Aを精製した。以下にその条件について示す。カラムはTSK gel ODS-80Ts (径21.5 mm X 長30 cm：東ソー社製) を用いた。溶媒A (蒸留水とアセトニトリルを容量比3 対 2で混合したもので0.1%トリフルオロ酢酸を含む) と溶媒B (蒸留水とアセトニトリルを容量比1 対 4で混合したもので0.1%トリフルオロ酢酸を含む) の溶出比は0 分から60分にかけて溶媒B比を直線的に50%から100 %に、続く20分間は溶媒B比を100 %に保持、最後に溶媒B比を50%にし20分間保持とした。溶出速度は5 ml/ 分、検出は370 nmで行い、1 分間ごとにフラクションを採取した。保持時間42.5分の検出のピークを含むフラクションを濃縮乾固することにより、高純度のキサントフモール (19.4 mg) を調製することができた。

(3) 調製したキサントフモール13.5 mg をジメチルスルホキシド溶液0.75 ml に溶解したものを、200 mlの10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5、10%のサッカロースを含む) に添加し、100℃で2時間加熱した。冷却後、反応液を逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。以下にその条件について示す。樹脂はコスモシール 140 C18-OPN (ナカライテスク社製：樹脂量20 ml) を用いた。反応液をカラムに供し、展開溶媒としてそれぞれ50 ml の蒸留水、20%、30%、40%、50%、60%、70% アセトニトリル水溶液、メタノールの順に溶出を行った。その結果、40% アセトニトリル水溶液溶出画分を濃縮乾固することにより、イソキサントフモール (2.1 mg) を得る事ができ、その構造を各種NMRスペクトルを測定し解析することにより構造を確認した。

(4) 調製したイソキサントフモールのNGF産生増強活性を実施例13と同

様の方法で測定した。イソキサントフモールは50、100、200  $\mu\text{M}$  となるように添加した。表56に示すようにイソキサントフモールは、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強し、ビール類飲料中のイソキサントフモールの生理活性が明らかとなった。

表 5 6

イソキサントフモール 試料濃度 ( $\mu\text{M}$ )	0	50	100	200
NGF産生量 (%)	100	110.7	121.4	198.0

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.181 ng/ml であった。)

### 実施例 3 6

(1) ビール3銘柄(市販品A、市販品B、市販品C)、およびノンアルコールビール飲料(市販品D)それぞれ150 mlをロータリーエバポレーターで60 mlまで濃縮し、それぞれの濃縮物を得た。

(2) 上記濃縮物のNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。ビール3銘柄濃縮物は2.5、5、10% (容量比) となるように添加した。ノンアルコール飲料濃縮物は10% (容量比) となるように添加した。その結果を表57に示した。ビール3銘柄濃縮物およびノンアルコール飲料濃縮物は、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 5 7

市販品A濃縮物 試料濃度 (%)	0	2.5	5	10
NGF 産生量 (%)	100	115.5	109.3	209.9
市販品B濃縮物 試料濃度 (%)	0	2.5	5	10
NGF 産生量 (%)	100	86.3	126.2	272.4
市販品C濃縮物 試料濃度 (%)	0	2.5	5	10
NGF 産生量 (%)	100	111.1	153.2	365.1
市販品D濃縮物 試料濃度 (%)	0			10
NGF 産生量 (%)	100			127.0

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.183 ng/ml であった。)

また市販品B濃縮物、市販品D濃縮物のHGF産生増強活性を実施例4-(1)と同様に測定した。市販品B濃縮物は1 % (容量比) となるように添加した。市販品D濃縮物は1 及び5 % (容量比) となるように添加した。その結果を表5 8に示した。各濃縮物は、MRC-5 細胞のHGF 産生を増強した。

表 5 8

<hr/>			
市販品B濃縮物			
試料濃度(%)	0	1	
HGF 產生量(%)	100	218	
<hr/>			
市販品D濃縮物			
試料濃度(%)	0	1	5
HGF 產生量(%)	100	160	158

(ただし、コントロールのHGF産生量は4.04 ng/mlであった。)

(3) 市販品A~D、及びビール市販品E~I、発泡酒市販品J~O中のキサントフォーム及びイソキサントフォーム含有量を質量分析装置を用いて測定した (Journal of Chromatography A、第832巻、第97~107頁(1997))

参照)。結果を表59に示す。各市販品には0.0005~0.032  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲でキサントフモールが含有されていた。また0.0082~1.27  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲でイソキサントフモールが含有されていた。これらの化合物、特にキサントフモール含量が多いほど、良好なビール風味の官能を示した。

表59

市販品	キサントフモール ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	イソキサントフモール ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
A	0.021	0.70
B	0.0073	0.58
C	0.0070	0.57
D	0.00060	0.034
E	0.0060	0.57
F	0.0073	0.53
G	0.017	0.48
H	0.021	1.27
I	0.00054	0.0082
J	0.0036	0.59
K	0.0041	0.16
L	0.0087	0.77
M	0.010	0.23
N	0.030	0.62
O	0.032	1.10

### 実施例37

(1) ホップ (*Humulus lupulus*) 乾燥品50 gを粉砕し、1,000 mlの蒸留水を加え60°Cで1時間抽出をおこなった。ろ過により残渣を除いたホップ水抽出液をロータリーエバポレーターで150 mlにまで濃縮した。濃縮液225 mlのクロロホルムを加えてしんとうし、水層とクロロホルム層および中間層に分画した。クロロホルム層画分を、ロータリーエバポレーターで溶媒留去後、濃縮し、ホップ水抽出物一クロロホルム移行画分を得た。

(2) 上記のホップ水抽出物一クロロホルム移行画分のNGF 産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。ホップ水抽出物一クロロホルム移行画分は最

終濃度が0.02、0.04 mg/mlとなるように添加した。その結果を表60に示した。ホップ水抽出物―クロロホルム移行画分は濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 6 0

ホップ水抽出物―クロロホルム移行画分 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
0	100
0.02	159.6
0.04	253.4

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.120 ng/mlであった。)

(3) ホップ乾燥品50 gを粉碎し、1,000 mlのエタノールを加え4℃で18時間抽出をおこなった。ろ過により残渣を除いたホップエタノール抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液にクロロホルム：水＝3：2の混液を加え、しんとうして水層とクロロホルム層に分画した。クロロホルム層画分を、ロータリーエバポレーターで溶媒留去後、濃縮し、ホップエタノール抽出物―クロロホルム移行画分を得た。

(4) 実施例37-(3)で得られたホップエタノール抽出物―クロロホルム移行画分のNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。ホップエタノール抽出物―クロロホルム移行画分は最終濃度が0.05、0.1 mg/mlとなるように添加した。その結果を表61に示した。ホップエタノール抽出物―クロロホルム移行画分はL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 6 1

ホップエタノール抽出物—クロロホルム移行画分 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
0	1 0 0
0. 0 5	2 4 5. 2
0. 1	2 4 0. 7

(ただし、コントロールのNGF 産生量は 0. 1 2 0 ng/ml であった。)

## 実施例 3 8

(1) 紫ウコン (ガジュツ) 5 g を凍結乾燥後、細断したものに 200ml のクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に対してこの抽出操作を 2 回繰り返した。ろ過後の液体部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固しクロロホルム抽出画分を得た。つぎに、クロロホルム抽出後の残渣に 200ml のエタノールを加え室温で抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に対してこの操作を 2 回繰り返した。ろ過後の液体部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、乾固物を 4 ml のエタノールに溶解した。エタノールに溶解した部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分-1 を得た。また、エタノールに溶解せず蒸留水に溶解した部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分-2 を得た。つぎに、エタノール抽出後の残渣に 25ml の蒸留水を加え 60 度で 2 時間抽出をおこなった。残渣を除いた液体部分に 2.5 倍量のエタノールを加え、マイナス 20 度で 1 時間静置した。その後、10,000G の遠心で沈殿物と液体部分に分画した。液体部分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固し水抽出画分-1 を得た。一方、沈殿物は、再び蒸留水に溶解し水抽出画分-2 を得た。

(2) 実施例 3 8 - (1) で調製した紫ウコンクロロホルム抽出画分、エタノール抽出画分-1、水抽出画分-1、水抽出画分-2 の NGF 産生増強活性を実施例 1 3 と同様の方法で測定した。紫ウコンクロロホルム抽出画分は 0.108、0.215 mg/ml となるように添加した。紫ウコンエタノール抽出画分-1 は 0.02、0.04

mg/mlとなるように添加した。紫ウコン水抽出画分-1は0.825、1.65、3.3 mg/mlとなるように添加した。紫ウコン水抽出画分-2は0.55 mg/mlとなるように添加した。その結果を表62に示した。紫ウコンクロロホルム抽出画分、エタノール抽出画分-1、水抽出画分-1、水抽出画分-2は、濃度依存的にL-M細胞のNGFを増強した。

表62

試料	濃度 (mg/ml)	NGF産生量 (%)
紫ウコンクロロホルム抽出画分	0	100
	0.108	172.4
	0.215	296.8
紫ウコンエタノール抽出画分-1	0	100
	0.02	149.8
	0.04	214.3
紫ウコン水抽出画分-1	0	100
	0.825	458.6
	1.65	500.5
	3.3	559.3
紫ウコン水抽出画分-2	0	100
	0.55	212.0

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.122 ng/mlであった。)

(3) 150 gの紫ウコンを凍結乾燥後、細断したものに300mlのクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に対してこの抽出操作を2回繰り返した。クロロホルム抽出後の残渣に300mlのエタノールを加え室温で抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に対してこの操作を2回繰り返した。エタノール抽出後の残渣に900mlの蒸留水を加え60度で2時間抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に対してこの操作を繰り返した。吸引ろ過で残渣を除いた液体部分を500 mlまで濃縮後、2.5倍量のエタノールを加え、マイナス20度で1時間静置した。その後、10,000Gの遠心で沈殿部分を除いた液体部分をロータリーエバポレー

ーターで濃縮乾固し紫ウコン水抽出画分—3を得た。

つぎに、紫ウコン水抽出画分—3の活性成分を合成吸着剤を用いて分画した。

以下にその条件について示す。

樹脂はアンバーライトXAD-2（オレガノ社製：樹脂量70 ml）を用いた。3.4 gの紫ウコン水抽出画分—3をXAD-2に供し、蒸留水140 mlで非吸着物を十分に洗い出し、次に350 mlのメタノールで吸着物を溶出した。メタノール溶出物をロータリーエバポレーターで濃縮し、紫ウコン水抽出低画分—3のXAD-2処理物を得た。

（4）上記の紫ウコン水抽出画分—3のXAD-2処理物のNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。紫ウコン水抽出画分—3のXAD-2処理物は0.5、1、2 mg/mlとなるように添加した。その結果を表63に示した。紫ウコン水抽出画分—3のXAD-2処理物は、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 6 3

試料濃度 (mg/ml)	0	0.5	1.0	2.0
NGF 産生量 (%)	100	340.2	526.6	607.2

（ただし、コントロールは0.328 ng/mlであった。）

またこの処理物のHGF産生増強活性を実施例4-（1）と同様の方法で測定した。紫ウコン水抽出低画分—3のXAD-2処理物は2000、1000、500、250  $\mu$ g/mlとなるように添加した。その結果を表64に示した。紫ウコン水抽出低画分—3 XAD-2処理物は、濃度依存的にMRC-5細胞のHGF産生を増強した。



表 6 4

試料濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	250	500	1000	2000
HGF 産生量(%)	100	112	128	149	192

(ただし、コントロールのHGF産生量は8.02 ng/mlであった。)

(5) 紫ウコン水抽出画分—3のXAD-2 処理物の活性成分を逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。

以下にその条件について示す。

樹脂はコスモシール 140 C18-OPN (ナカライテスク社製：樹脂量70 ml) を用いた。紫ウコン水抽出画分—3のXAD-2 処理物0.444 g を供し、展開溶媒としてそれぞれ140 mlの蒸留水、5 %アセトニトリル水溶液、10% アセトニトリル水溶液、20%アセトニトリル水溶液、40% アセトニトリル水溶液、アセトニトリル、アセトンの順に溶出を行い、各溶出画分を減圧濃縮した。

(6) 紫ウコン水抽出画分—3のXAD-2 由来の逆相クロマトグラフィー画分のNGF 産生増強活性を実施例 1 3 と同様の方法で測定した。表 6 5にその結果を示す。表に示すように、蒸留水溶出画分、10% アセトニトリル水溶液溶出画分、20 %アセトニトリル水溶液溶出画分、40% アセトニトリル水溶液溶出画分、アセトニトリル溶出画分、アセトン溶出画分にNGF 産生増強活性があることが明らかになった。

表 6 5

	濃度 (mg/ml)	NGF 産生量 (%)
蒸留水溶出画分	0.25	103.2
	0.5	133.0
	1.0	147.1
10% アセトニトリル水溶液溶出画分	0.25	117.7
	0.5	130.6
	1.0	157.1
20% アセトニトリル水溶液溶出画分	0.25	154.6
	0.5	192.7
	1.0	229.9
40% アセトニトリル水溶液溶出画分	0.25	185.1
	0.5	255.4
	1.0	373.8
アセトニトリル溶出画分	0.025	135.6
	0.05	163.6
	0.1	170.0
アセトン溶出画分	0.025	110.4
	0.05	121.0
	0.1	140.1

(ただし、コントロールのNGF 産生量は、0.307 ng/ml であった。)

また紫ウコン水抽出低画分-3のXAD-2 由来の逆相クロマトグラフィー画分のHGF 産生増強活性を実施例4-(1)と同様の方法で測定した。その結果、蒸留水溶出画分、5%アセトニトリル水溶液溶出画分、10% アセトニトリル水溶液溶出画分、20% アセトニトリル水溶液溶出画分にHGF 産生増強活性があることが明らかになった。表6 6にその結果を示す。

表 6 6

画分	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	HGF産生量 (%)
蒸留水溶出画分	20	127
	2	106
5%アセトニトリル水溶液溶出画分	200	119
	20	121
10% アセトニトリル水溶液溶出画分	2000	264
	200	126
20% アセトニトリル水溶液溶出画分	2000	169
	200	111

(ただし、コントロールのHGF産生量は、蒸留水溶出画分、5%アセトニトリル水溶液溶出画分は8.10 ng/ml、10% アセトニトリル水溶液溶出画分は9.00 ng/ml、20% アセトニトリル水溶液溶出画分は9.56 ng/mlであった。)

### 実施例 3 9

(1) 大豆胚芽(紀文社製)を細断したもの10g に200ml のクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に対してこの抽出操作を2回繰り返した。クロロホルム抽出後の残渣に200ml のエタノールを加え室温で抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に対してこの操作を2回繰り返した。ろ過後の液体部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、乾固物を5 mlのエタノールに溶解した。エタノールに溶解した部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分—1を得た。また、エタノールに溶解せず蒸留水に溶解した部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分—2を得た。つぎに、エタノール抽出後の残渣に200ml の蒸留水を加え60度で2 時間抽出をおこなった。10,000Gの遠心で残渣を除いた液体部分に2.5 倍量のエタノールを加え、マイナス20度で1 時間静置した。その後、10,000Gの遠心で沈殿物と液体部分に分画した。液体部分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固し水抽出画分—1を得た。一方、沈殿物を蒸留水に溶解し水抽出画分—2を得た。

(2) 上記の大豆胚芽エタノール抽出画分—2、水抽出画分—1、水抽出画分—2のNGF 産生増強活性を実施例 1 3と同様の方法で測定した。大豆胚芽エタノール抽出画分—2は0.8875、1.775、3.55 mg/mlとなるように添加した。大豆胚

芽水抽出画分-1 は4.998、9.975、19.95 mg/ml となるように添加した。大豆胚芽水抽出画分-2 は3.36、6.72、13.44 mg/ml となるように添加した。その結果を表67、68示した。大豆胚芽エタノール抽出画分-2、水抽出画分-1、水抽出画分-2 は、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 6 7

エタノール抽出画分-2				
試料濃度 (mg/ml)	0	0.8875	1.775	3.55
NGF 産生量 (%)	100	543.9	523.3	589.2
水抽出画分-1				
試料濃度 (mg/ml)	0	4.988	9.975	19.95
NGF 産生量 (%)	100	287.4	465.6	1215.3

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.251 ng/ml であった。)

表 6 8

水抽出画分-2				
試料濃度 (mg/ml)	0	3.36	6.72	13.44
NGF 産生量 (%)	100	250.1	259.1	299.8

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.223 ng/ml であった。)

また大豆胚芽水抽出画分-1、水抽出画分-2 のHGF産生増強活性を実施例4-(1)と同様の方法で測定した。大豆胚芽水抽出画分-1 は1995、199.5  $\mu$ g/mlとなるように添加した。大豆胚芽水抽出画分-2 は1344、134.4  $\mu$ g/mlとなるように添加した。その結果を表69に示した。大豆胚芽水抽出画分-1、水抽出画分-2 は、濃度依存的にMRC-5細胞のHGF産生を増強した。

表 6 9

大豆胚芽水抽出画分-1			
試料濃度( $\mu$ g/ml)	0	199.5	1995
HGF 産生量(%)	100	125	138
大豆胚芽水抽出画分-2			
試料濃度( $\mu$ g/ml)	0	134.4	1344
HGF 産生量(%)	100	107	116

(ただし、コントロールのHGF産生量は14.92 ng/mlであった。)

(3) 大豆種皮(紀文社製)を細断したもの10gに200mlのクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に対してこの抽出操作を2回繰り返した。クロロホルム抽出後の残渣に200mlのエタノールを加え室温で抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に対してこの操作を2回繰り返した。ろ過後の液体部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、乾固物を3mlのエタノールに溶解した。エタノールに溶解した部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、種皮エタノール抽出画分-1を得た。また、エタノールに溶解せず蒸留水に溶解した部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、種皮エタノール抽出画分-2を得た。つぎに、エタノール抽出後の残渣に70mlの蒸留水を加え60度で2時間抽出をおこなった。吸引ろ過で残渣を除いた液体部分に2.5倍量のエタノールを加え、マイナス20度で1時間静置した。その後、10,000Gの遠心で沈殿物と液体部分に分画した。液体部分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、種皮水抽出画分-1を得た。一方、沈殿物を蒸留水に溶解し、種皮水抽出画分-2を得た。

(4) 上記の大豆種皮エタノール抽出画分-2、種皮水抽出画分-1、種皮水抽出画分-2のNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。大豆種皮エタノール抽出画分-2は0.275、0.55 mg/mlとなるように添加した。大豆種皮水抽出画分-1は3.125、6.25、12.5 mg/mlとなるように添加した。大豆種皮水抽出画分-2は0.654、1.308、2.616 mg/mlとなるように添加した。その結

果を表 7 0、7 1 に示した。大豆種皮エタノール抽出画分-2、種皮水抽出画分-1、種皮水抽出画分-2 は、濃度依存的に L-M 細胞の NGF 産生を増強した。

表 7 0

種皮エタノール抽出画分-2			
試料濃度 (mg/ml)	0	0.275	0.55
NGF 産生量 (%)	100	379.1	462.5

(ただし、コントロールの NGF 産生量は 0.251 ng/ml であった。)

表 7 1

種皮水抽出画分-1				
試料濃度 (mg/ml)	0	3.125	6.25	12.5
NGF 産生量 (%)	100	131.4	144.1	307.9

種皮水抽出画分-2				
試料濃度 (mg/ml)	0	0.654	1.308	2.616
NGF 産生量 (%)	100	310.2	436.8	512.3

(ただし、コントロールの NGF 産生量は 0.223 ng/ml であった。)

また大豆種皮水抽出画分-1、水抽出画分-2 の HGF 産生増強活性を実施例 4-(1) と同様の方法で測定した。大豆種皮水抽出画分-1 は 125、1250  $\mu$ g/ml となるように添加した。大豆種皮水抽出画分-2 は 26.16、261.6  $\mu$ g/ml となるように添加した。その結果を表 7 2、7 3 に示した。大豆種皮水抽出画分-1、水抽出画分-2 は、濃度依存的に MRC-5 細胞の HGF 産生を増強した。

表 7 2

大豆種皮水抽出画分-1			
試料濃度 ( $\mu$ g/ml)	0	125	1250
HGF 産生量 (%)	100	134	218

(ただし、コントロールの HGF 産生量は 14.92 ng/ml であった。)

表 7 3

大豆種皮水抽出画分-2			
試料濃度( $\mu\text{g/ml}$ )	0	26.16	261.6
HGF 産生量(%)	100	115	128

(ただし、コントロールのHGF産生量は8.24 ng/mLであった。)

(5) ソヤミール(紀文社製)を細断したもの10g に200ml のクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に対してこの抽出操作を2回繰り返した。クロロホルム抽出後の残渣に200ml のエタノールを加え室温で抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に対してこの操作を2回繰り返した。ろ過後の液体部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、乾固物を3 mlのエタノールに溶解した。エタノールに溶解した部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、ソヤミールのエタノール抽出画分-1を得た。また、エタノールに溶解せず蒸留水に溶解した部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、ソヤミールのエタノール抽出画分-2を得た。つぎに、エタノール抽出後の残渣に100ml の蒸留水を加え60度で2 時間抽出をおこなった。10,000 Gの遠心で残渣を除いた液体部分に2.5 倍量のエタノールを加え、マイナス20度で1 時間静置した。その後、10,000 Gの遠心で沈殿物と液体部分に分画した。液体部分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、ソヤミール水抽出画分-1を得た。一方、沈殿物を蒸留水に溶解し、ソヤミール水抽出画分-2を得た。

(6) 上記のソヤミールのエタノール抽出画分-2、ソヤミール水抽出画分-1のNGF 産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。ソヤミールのエタノール抽出画分-2は0.488、0.975 mg/ml となるように添加した。ソヤミール水抽出画分-1は2.625、5.25 mg/mlとなるように添加した。その結果を表74、75に示した。ソヤミールのエタノール抽出画分-2、ソヤミール水抽出画分-1は、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 7 4

ソヤミールのエタノール抽出画分-2			
試料濃度 (mg/ml)	0	0.488	0.975
NGF 産生量 (%)	100	426.5	400.7

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.251 ng/ml であった。)

表 7 5

ソヤミール水抽出画分-1			
試料濃度 (mg/ml)	0	2.625	5.25
NGF 産生量 (%)	100	284.7	283.5

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.223 ng/ml であった。)

またソヤミール水抽出画分-1、水抽出画分-2 のHGF 産生増強活性を実施例 4-(1)と同様の方法で測定した。ソヤミール水抽出画分-1 は105、1050  $\mu$ g/mlとなるように添加した。ソヤミール水抽出画分-2 は56.5、565  $\mu$ g/mlとなるように添加した。その結果を表 7 6 に示した。ソヤミール水抽出画分-1、水抽出画分-2 は、濃度依存的にMRC-5 細胞のHGF 産生を増強した。

表 7 6

ソヤミール水抽出画分-1			
試料濃度 ( $\mu$ g/ml)	0	105	1050
HGF 産生量 (%)	100	142	131
ソヤミール水抽出画分-2			
試料濃度 ( $\mu$ g/ml)	0	56.5	565
HGF 産生量 (%)	100	127	171

(ただし、コントロールのHGF産生量は14.47 ng/ml であった。)

#### 実施例 4 0

(1) モロヘイヤ葉粉末 (皇漢薬品研究所製) 5gに200ml のクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に対してこの抽出操作を2回繰り返す。



返した。クロロホルム抽出後の残渣に200mlのエタノールを加え室温で抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に対してこの操作を2回繰り返した。ろ過後の液体部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、乾固物を17 mlのエタノールに溶解した。エタノールに溶解した部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分—1を得た。また、エタノールに溶解せず蒸留水に溶解した部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分—2を得た。つぎに、エタノール抽出後の残渣に80mlの蒸留水を加え60度で2時間抽出をおこなった。10,000 Gの遠心で残渣を除いた液体部分に2.5倍量のエタノールを加え、マイナス20度で1時間静置した。その後、10,000 Gの遠心で沈殿物と液体部分に分画した。液体部分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固し水抽出画分—1を得た。一方、沈殿物は蒸留水に再溶解後、蒸留水に対して透析（透析膜：Seamless Cellulose Tubing UC36-32-100、三光純薬社製）を行った。透析内液に2.5倍量のエタノールを加え、マイナス20度で1時間静置した。その後、10,000 Gの遠心で沈殿物と液体部分に分画した。沈殿物を蒸留水に溶解し水抽出画分—2を得た。

（2）上記のモロヘイヤ葉エタノール抽出画分—2、水抽出画分—1、水抽出画分—2のNGF産生増強活性を実施例13と同様の方法で測定した。モロヘイヤ葉エタノール抽出画分—2は0.15、0.3 mg/mlとなるように添加した。モロヘイヤ葉水抽出画分—1は1.41 mg/mlとなるように添加した。モロヘイヤ葉水抽出画分—2は0.01、0.02、0.04mg/mlとなるように添加した。その結果を表77に示した。モロヘイヤ葉エタノール抽出画分—2、水抽出画分—1、水抽出画分—2は、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 7 7

エタノール抽出画分-2				
試料濃度 (mg/ml)	0	0.15	0.3	
NGF 産生量 (%)	100	256.1	295.7	
水抽出画分-1				
試料濃度 (mg/ml)	0	1.41		
NGF 産生量 (%)	100	843.4		
水抽出画分-2				
試料濃度 (mg/ml)	0	0.01	0.02	0.04
NGF 産生量 (%)	100	250.5	300.2	372.6

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.122 ng/mlであった。)

また、モロヘイヤ葉水抽出画分-1、水抽出画分-2のHGF産生増強活性を実施例4-(1)と同様の方法で測定した。モロヘイヤ葉水抽出画分-1は225.5、22.55、2.255  $\mu$ g/mlとなるように添加した。モロヘイヤ葉水抽出画分-2は20、8、4、0.4、0.04  $\mu$ g/mlとなるように添加した。その結果を表78、79に示した。モロヘイヤ葉水抽出画分-1、水抽出画分-2は、濃度依存的にMRC-5細胞のHGF産生を増強した。

表 7 8

モロヘイヤ葉水抽出画分-1				
試料濃度 ( $\mu$ g/ml)	0	2.255	22.55	225.5
HGF 産生量 (%)	100	232	406	612

(ただし、コントロールのHGF産生量は5.96 ng/mlであった。)

表 7 9

モロヘイヤ葉水抽出画分-2						
試料濃度 ( $\mu$ g/ml)	0	0.04	0.4	4	8	20
HGF 産生量 (%)	100	117	129	188	266	449

(ただし、コントロールのHGF産生量は9.56 ng/mlであった。)

## 実施例 4 1

(1) 米糠10g に200ml のクロロホルムを加え室温で抽出をおこなった。吸引ろ過後の残渣に対してこの抽出操作を2回繰り返した。ろ過後の液体部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固しクロロホルム抽出画分を得た。クロロホルム抽出後の残渣に200ml のエタノールを加え室温で抽出をおこなった。残渣に対してこの操作を2回繰り返した。ろ過後の液体部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、乾固物を35 ml のエタノールに溶解した。エタノールに溶解した部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分—1を得た。また、エタノールに溶解せず蒸留水に溶解した部分を集めロータリーエバポレーターで濃縮乾固しエタノール抽出画分—2を得た。つぎに、エタノール抽出後の残渣に100ml の蒸留水を加え60度で2 時間抽出をおこなった。10,000 Gの遠心で残渣を除いた液体部分に2.5 倍量のエタノールを加え、マイナス20度で1 時間静置した。その後、10,000 Gの遠心で沈殿物と液体部分に分画した。液体部分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固し水抽出画分—1を得た。一方、沈殿物を蒸留水に溶解し水抽出画分—2を得た。

(2) 上記の調製した米糠クロロホルム抽出画分、エタノール抽出画分—1、エタノール抽出画分—2、水抽出画分—1、水抽出画分—2のNGF 産生増強活性を実施例 1 3と同様の方法で測定した。米糠クロロホルム抽出画分は4.4、8.8 mg/ml となるように添加した。米糠エタノール抽出画分—1は0.125、0.25、0.5、1.0 mg/ml となるように添加した。米糠エタノール抽出画分—2は0.625、1.25、2.5、5.0 mg/ml となるように添加した。米糠水抽出画分—1は0.625、1.25、2.5、5.0 mg/ml となるように添加した。米糠水抽出画分—2は0.625、1.25、2.5、5.0 mg/ml となるように添加した。その結果を表 8 0に示した。米糠クロロホルム抽出画分、エタノール抽出画分—1、エタノール抽出画分—2、水抽出画分—1、水抽出画分—2は、濃度依存的にL-M細胞のNGF産生を増強した。

表 8 0

クロロホルム抽出画分					
試料濃度 (mg/ml )	0	4.4	8.8		
NGF 産生量 (%)	100	125.8	181.8		
エタノール抽出画分-1					
試料濃度 (mg/ml )	0	0.125	0.25	0.5	1.0
NGF 産生量 (%)	100	239.6	318.6	357.3	373.0
エタノール抽出画分-2					
試料濃度 (mg/ml )	0	0.625	1.25	2.5	5.0
NGF 産生量 (%)	100	313.0	393.7	445.9	685.8
水抽出画分-1					
試料濃度 (mg/ml )	0	0.625	1.25	2.5	5.0
NGF 産生量 (%)	100	151.0	177.4	291.1	559.1
水抽出画分-2					
試料濃度 (mg/ml )	0	0.625	1.25	2.5	5.0
NGF 産生量 (%)	100	138.1	185.8	248.0	428.5

(ただし、コントロールのNGF産生量は0.172 ng/ml であった。)

また水抽出画分-1のHGF産生増強活性を実施例4-(1)と同様の方法で測定した。米糠水抽出画分-1は1000、100  $\mu$ g/ml となるように添加した。その結果を表81に示した。米糠水抽出画分-1は、濃度依存的にMRC-5細胞のHGF産生を増強した。

表 8 1

水抽出画分			
試料濃度 ( $\mu$ g/ml)	0	100	1000
HGF 産生量 (%)	100	107	157

(ただし、コントロールのHGF産生量は4.04 ng/mlであった。)

#### 実施例 4 2

(1) 市販のウーロン茶葉を通常の2倍濃度に抽出し、500mlを得た。こ

れに表 8 2 に示す配合に従ってアルコール含有ウーロン茶を 1 0 0 0 m l 調製した。

表 8 2

ウーロン茶	5 0 %
1 / 5 レモン果汁	0 . 1 %
クエン酸又はクエン酸 N a	適量
ビタミン C	0 . 0 2 %
砂糖 ( ケーン )	4 . 5 %
エチルアルコール ( v / v )	4 . 0 %
p H	3 . 7
精製水	残余

( 2 ) タケの葉粉末 7 g を 1 0 0 m l の精製水にけんだくし、 6 0 ° C で 1 時間抽出した抽出物の凍結乾燥物を調製し、上記アルコール含有ウーロン茶に、当該乾燥物が 0 . 1  $\mu$  g / m l となるように添加したアルコール飲料を調製した。当該乾燥物中のイソオリエンチンが 1 0 0  $\mu$  g / m l となるように当該乾燥物を添加したアルコール飲料を調製した。

( 3 ) タマネギ薄皮 5 g を 1 0 0 m l の精製水にけんだくし、 1 0 0 ° C で 1 5 分抽出した抽出物を調製し、上記アルコール含有ウーロン茶に、当該抽出物が 1 0 0 倍希釈液となるように添加したアルコール飲料を調製した。

( 4 ) イチョウ茶葉 3 g を精製水 2 0 0 m l にけんだくし、 1 0 0 ° C で 1 5 分抽出した抽出物の凍結乾燥物を調製し、当該乾燥物を精製水 8 m l に溶解した後、上記アルコール含有ウーロン茶に、当該溶解液が 1 0 0 倍希釈となるように添加したアルコール飲料を調製した。

( 5 ) ヨモギ乾燥品 1 0 g に精製水 1 5 0 m l を添加し、 6 0 ° C で 1 時間抽出した抽出物を調製し、上記アルコール含有ウーロン茶に、当該抽出物由来の 3 , 5 - ジカフェオイルキナ酸が 5  $\mu$  g / m l となるように添加したアルコール含有飲料を調製した。また当該抽出物由来のクロロゲン酸が 4 0  $\mu$  g / m l となるよ

うに添加したアルコール含有飲料を調製した。

(6) アシタバ(葉茎部)乾燥品480gを精製水2リットルにけんだくし、60℃で1時間抽出した抽出物を調製し、上記アルコール含有ウーロン茶に、当該抽出物中のクロロゲン酸が10 $\mu$ g/mlとなるように添加したアルコール含有飲料を調製した。

(7) 菊花乾燥物15gを精製水150mlにけんだくし、60℃で2時間抽出した抽出物を調製し、上記アルコール含有ウーロン茶に、当該抽出物が100倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製した。

(8) 紫ウコン乾燥品5gを精製水25mlにけんだくし、60℃で2時間抽出した抽出物の凍結乾燥物を調製し、上記アルコール含有ウーロン茶に、当該乾燥物が10 $\mu$ g/mlとなるように添加したアルコール含有飲料を調製した。

(9) プラム300gを500mlのエタノールとともにホモゲナイズし、ろ過によりろ液を調製し、上記アルコール含有ウーロン茶に、当該抽出物が1000倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製した。当該抽出物を使用し、飲料中の5-カフェオイルキナ酸、4-カフェオイルキサン酸がそれぞれ100 $\mu$ g/mlとなるアルコール含有飲料を調製した。

(10) ブロッコリー300gを50%エタノール水溶液350mlとともにホモゲナイズし、ろ過によりろ液を調製し、当該ろ液を150mlに濃縮した。上記アルコール含有ウーロン茶に、当該濃縮液が1000倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製した。

(11) 春菊の凍結乾燥物10gを粉碎し、エタノールで洗浄後、100mlの水を添加し、60℃で1時間加熱し、抽出液を調製し、上記アルコール含有ウーロン茶に、当該濃縮液が1000倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製した。

(12) 春菊900gを80%エタノール水溶液2リットルとともにホモゲナイズし、ろ過によりろ液を調製し、当該ろ液を50mlに濃縮した。上記アルコ

ール含有ウーロン茶に、当該濃縮液が1000倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製した。また当該アルコール含有飲料には3,5-ジカフェオイルキナ酸が $10\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように当該濃縮液を使用しアルコール含有飲料を調製した。

(13) 市販のビール(前出市販品B)15リットルを6リットルに濃縮し、上記アルコール含有ウーロン茶に、当該濃縮液が100倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製した。

(14) 市販のノンアルコールビール飲料(前出市販品D)15リットルを6リットルに濃縮し、上記アルコール含有ウーロン茶に、当該濃縮液が100倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製した。

(15) 大豆胚芽細断物10gをエタノール200mlで洗浄した後、200mlの水を添加し、60℃で2時間加熱し、抽出液を調製した。抽出液をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分と、エタノール不溶画分のそれぞれの乾燥物を調製した。エタノール可溶画分の乾燥物が $200\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、上記アルコール含有ウーロン茶に添加したアルコール含有飲料を調製した。

またエタノール不溶画分の乾燥物が $130\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、上記アルコール含有ウーロン茶に添加したアルコール含有飲料を調製した。

(16) 大豆種皮細断物10gをエタノール200mlで洗浄した後、70mlの水を添加し、60℃で2時間加熱し、抽出液を調製した。抽出液をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分と、エタノール不溶画分のそれぞれの乾燥物を調製した。エタノール可溶画分の乾燥物が $130\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、上記アルコール含有ウーロン茶に添加したアルコール含有飲料を調製した。

またエタノール不溶画分の乾燥物が $30\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、上記アルコール含有ウーロン茶に添加したアルコール含有飲料を調製した。

(17) ソヤミール細断物10gをエタノール200mlで洗浄した後、100mlの水を添加し、60℃で2時間加熱し、抽出液を調製した。抽出液をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分と、エタノール不溶画分のそれぞれの乾燥物を調製した。エタノール可溶画分の乾燥物が100 $\mu$ g/mlとなるように、上記アルコール含有ウーロン茶に添加したアルコール含有飲料を調製した。

またエタノール不溶画分の乾燥物が60 $\mu$ g/mlとなるように、上記アルコール含有ウーロン茶に添加したアルコール含有飲料を調製した。

(18) モロヘイヤ葉粉末5gをエタノール200mlで洗浄した後、80mlの水を添加し、60℃で2時間加熱し、抽出液を調製した。抽出液をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分と、エタノール不溶画分のそれぞれの乾燥物を調製した。エタノール可溶画分の乾燥物が2 $\mu$ g/mlとなるように、上記アルコール含有ウーロン茶に添加したアルコール含有飲料を調製した。

またエタノール不溶画分の乾燥物が4 $\mu$ g/mlとなるように、上記アルコール含有ウーロン茶に添加したアルコール含有飲料を調製した。

(19) 米ぬか10gをエタノール200mlで洗浄した後、100mlの水を添加し、60℃で2時間加熱し、抽出液を調製した。抽出液をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分の乾燥物を調製した。エタノール可溶画分の乾燥物が1mg/mlとなるように、上記アルコール含有ウーロン茶に添加したアルコール含有飲料を調製した。

(20) 上記実施例42-(2)～(19)に記載のアルコール含有飲料は、風味のよい、かつ、HGF産生増強能を有する清涼アルコール飲料であった。

またこれらの飲料のカーボネーションを行い、発泡タイプの飲料を調製した。

またこれらの飲料中のHGF産生増強能を有する有効成分を20倍量含有するノンアルコールタイプの飲料を調製した。これらの飲料は、いずれも良好な風味



と、高いHGF産生増強能を示した。

#### 実施例 4 3

(1) 表 8 3 に記載の配合に従ってアルコール含有果汁を調製した。

表 8 3

1 / 6 グレープフルーツ果汁	0. 5 6 %
クエン酸又はクエン酸Na	適量
ビタミンC	0. 0 2 %
果糖ブドウ糖液糖	1. 5 %
水飴	2. 2 %
エチルアルコール (v / v)	3. 0 %
pH	3. 3
精製水	残余

(2) 市販のベニバナ黄色色素を、上記アルコール含有果汁に、当該色素が 1 . 2 5 m g / m l となるように添加し、アルコール含有飲料を調製した。当該飲料中にはその有効成分としてサフロミンAが高含有されていた。またベニバナ乾燥物 1 0 g を精製水 1 5 0 m l にけんだくし、6 0 °C で 2 時間抽出した抽出物の凍結乾燥物を、上記アルコール含有果汁に、当該乾燥物中のサフロミンAが 3 m g / m l となるように添加しアルコール含有飲料を調製した。

(3) 市販の菊花乾燥物 1 5 g を精製水 1 5 0 m l にけんだくし、6 0 °C で 2 時間抽出した抽出物の凍結乾燥物を、上記アルコール含有果汁に、当該乾燥物が 2 0 m g / m l となるように添加しアルコール含有飲料を調製した。

また上記アルコール含有果汁に、グアイアノライドが 2 0  $\mu$  g / m l となるように上記凍結乾燥物を添加し、アルコール含有飲料を調製した。

(4) アシタバ乾燥物 (葉茎部) 2 0 g を精製水 3 6 0 m l にけんだくし、6 0 °C で 2 時間抽出した抽出物の凍結乾燥物を、上記アルコール含有果汁に、当該乾燥物が 4 0 0  $\mu$  g / m l となるように添加し、アルコール含有飲料を調製した。

。

またアシタバ乾燥物（根部）20 gを精製水360 mlにけんだくし、60℃で2時間抽出した抽出物の凍結乾燥物を、上記アルコール含有果汁に、当該乾燥物が600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加し、アルコール含有飲料を調製した。

さらに上記アルコール含有果汁にキサントアングロールが10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように当該乾燥物を添加し、アルコール含有飲料を調製した。

また上記アルコール含有果汁に3'-O- $\beta$ -D-グルコピラノイル ケラクトンが50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように当該乾燥物を添加して、アルコール含有飲料を調製した。

また上記アルコール含有果汁に7-O- $\beta$ -D-グルコピラノシルオキシ-8-プレニルクマリンが30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように当該乾燥物を添加して、アルコール含有飲料を調製した。

また上記アルコール含有果汁にコーヒー酸メチルエステルが20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように当該乾燥物を添加して、アルコール含有飲料を調製した。

また上記アルコール含有果汁に8-カルボキシル-3-ヒドロキシ-5-メトキシル-2-ジメチルクロマンが3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように当該乾燥物を添加して、アルコール含有飲料を調製した。

また上記アルコール含有果汁に7- $\beta$ -D-グルコピラノシルオキシ-6-プレニルクマリンが300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように当該乾燥物を添加して、アルコール含有飲料を調製した。

また上記アルコール含有果汁に4'-O-アングロイル-3'-O-[6-O-( $\beta$ -D-グルコピラノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル]-ケラクトンが400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように当該乾燥物を添加して、アルコール含有飲料を調製した。

また上記アルコール含有果汁にコーヒー酸エチルエステルが30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように当該乾燥物を添加して、アルコール含有飲料を調製した。

(5) タマネギ薄皮 25 g を 95 % v / v エチルアルコール 500 ml にけんだくし、室温で抽出した抽出液の乾燥物を調製し、上記アルコール含有果汁に、当該乾燥物が 100  $\mu$ g / ml となるように添加し、アルコール含有飲料を調製した。

(6) イチョウ茶葉 3 g を精製水 200 ml にけんだくし、100℃で1時間抽出した抽出物の凍結乾燥物を調製し、上記アルコール含有果汁に、当該乾燥物が 700  $\mu$ g / ml となるように添加し、アルコール含有飲料を調製した。

(7) 市販のバラ花 2 g を精製水 40 ml にけんだくし、60℃で1時間抽出し多抽出物の凍結乾燥物を調製し、上記アルコール含有果汁に、当該乾燥物が 80  $\mu$ g / ml となるように添加し、アルコール含有飲料を調製した。

(8) 市販のホップエキスを使用し、キサントフモール含量が 3  $\mu$ g / ml となるように、上記アルコール含有果汁に添加し、アルコール含有飲料を調製した。

(9) 市販のホップエキスを乾燥重量として 10  $\mu$ g / ml となるように、上記アルコール含有果汁に添加し、アルコール含有飲料を調製した。

(10) 市販のホップエキスを使用し、キサントフモールB、キサントフモールDの総量が 20  $\mu$ g / ml となるように、上記アルコール含有果汁に添加し、アルコール含有飲料を調製した。

(11) 市販のホップエキスを使用し、イソキサントフモール含量が 80  $\mu$ g / ml となるように、上記アルコール含有果汁に添加し、アルコール含有飲料を調製した。

(12) 市販のビール（前出市販品B）15リットルを6リットルに濃縮し、上記アルコール含有果汁に、当該濃縮液が10倍希釈液となるように添加したアルコール含有飲料を調製した。

(13) 市販のノンアルコールビール飲料（前出市販品D）15リットルを6リットルに濃縮し、上記アルコール含有果汁に、当該濃縮液が10倍希釈液とな

るように添加したアルコール含有飲料を調製した。

(14) 市販のホップエキスをを用いてキサントフモール含量が $0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、イソキサントフモール含量が $1.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、上記アルコール含有果汁に添加し、アルコール含有飲料を調製した。

また市販のホップエキスをを用いてキサントフモール含量が $0.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、イソキサントフモール含量が $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、上記アルコール含有果汁に添加し、アルコール含有飲料を調製した。

(15) ホップ乾燥物 $50 \text{g}$ を粉碎し、1リットルのエタノールで抽出し、抽出液を濃縮した。濃縮物を乾燥重量として $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、上記アルコール含有果汁に添加し、アルコール含有飲料を調製した。

(16) 紫ウコン $5 \text{g}$ の細断物を精製水 $25 \text{ml}$ にけんだくし、 $60^\circ\text{C}$ で2時間抽出した抽出物の凍結乾燥物を、上記アルコール含有果汁に、当該乾燥物が $600 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し、アルコール含有飲料を調製した。

(17) 大豆胚芽細断物 $10 \text{g}$ をエタノール $200 \text{ml}$ で洗浄した後、 $200 \text{ml}$ の水を添加し、 $60^\circ\text{C}$ で2時間加熱し、抽出液を調製した。抽出液をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分と、エタノール不溶画分のそれぞれの乾燥物を調製した。エタノール可溶画分の乾燥物が $5 \text{mg}/\text{ml}$ となるように、上記アルコール含有果汁に添加したアルコール含有飲料を調製した。

またエタノール不溶画分の乾燥物が $3 \text{mg}/\text{ml}$ となるように、上記アルコール含有果汁に添加したアルコール含有飲料を調製した。

(18) 大豆種皮細断物 $10 \text{g}$ をエタノール $200 \text{ml}$ で洗浄した後、 $70 \text{ml}$ の水を添加し、 $60^\circ\text{C}$ で2時間加熱し、抽出液を調製した。抽出液をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分と、エタノール不溶画分のそれぞれの乾燥物を調製した。エタノール可溶画分の乾燥物が $3 \text{mg}/\text{ml}$ となるように、上記アルコール含有ウーロン茶に添加したア

ルコール含有飲料を調製した。

またエタノール不溶画分の乾燥物が  $600 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように、上記アルコール含有果汁に添加したアルコール含有飲料を調製した。

(19) ソヤミール細断物  $10 \text{ g}$  をエタノール  $200 \text{ ml}$  で洗浄した後、 $100 \text{ ml}$  の水を添加し、 $60^\circ\text{C}$  で2時間加熱し、抽出液を調製した。抽出液をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分と、エタノール不溶画分のそれぞれの乾燥物を調製した。エタノール可溶画分の乾燥物が  $3 \text{ mg}/\text{ml}$  となるように、上記アルコール含有果汁に添加したアルコール含有飲料を調製した。

またエタノール不溶画分の乾燥物が  $60 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように、上記アルコール含有ウーロン茶に添加したアルコール含有飲料を調製した。

(20) モロヘイヤ葉粉末  $5 \text{ g}$  をエタノール  $200 \text{ ml}$  で洗浄した後、 $80 \text{ ml}$  の水を添加し、 $60^\circ\text{C}$  で2時間加熱し、抽出液を調製した。抽出液をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分と、エタノール不溶画分のそれぞれの乾燥物を調製した。エタノール可溶画分の乾燥物が  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように、上記アルコール含有果汁に添加したアルコール含有飲料を調製した。

またエタノール不溶画分の乾燥物が  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように、上記アルコール果汁に添加したアルコール含有飲料を調製した。

(21) 米ぬか  $10 \text{ g}$  をエタノール  $200 \text{ ml}$  で洗浄した後、 $100 \text{ ml}$  の水を添加し、 $60^\circ\text{C}$  で2時間加熱し、抽出液を調製した。抽出液をろ過し、ろ液を得た後に、ろ液に2.5倍量のエタノールを加え、エタノール可溶画分とエタノール不溶画分のそれぞれの乾燥物を調製した。エタノール可溶画分の乾燥物が  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように、上記アルコール含有果汁に添加したアルコール含有飲料を調製した。またエタノール不溶画分の乾燥物が  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように、上記アルコール含有果汁に添加したアルコール含有飲料を調製した。

(22) 上記実施例43-(2)～(21)に記載のアルコール含有果汁飲料は、風味のよい、かつ、NGF産生増強能を有する清涼アルコール飲料であった。

またこれらの飲料のカーボネーションを行い、発泡タイプの飲料を調製した。

またこれらの飲料中のNGF産生増強能を有する有効成分を20倍量含有するノンアルコールタイプの飲料を調製した。これらの飲料は、いずれも良好な風味と、高いNGF産生増強能を示した。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、植物由来の成長因子産生増強物質を含有する成長因子産生増強用組成物、当該組成物を含有する成長因子産生増強を必要とする疾患に有効な医薬、食品、飲料又は飼料が提供される。該医薬は生体内における成長因子産生増強活性を有し、肝炎、重症肝炎、劇症肝炎、肝硬変、肝内胆汁うっ滞等の肝障害、薬剤等による腎障害、胃腸障害、血管障害、慢性腎炎、肺炎、創傷、糖尿病、がん、痴呆症または神経障害等の成長因子の産生増強を必要とする疾患の治療剤又は予防剤として有用である。また、該食品又は飲料は、日常の飲食品として摂取することにより、成長因子の産生増強を要する疾患の症状改善等が可能となる。従って、植物由来の成長因子産生増強作用を有する物質を有効成分とする機能性飲食品はその成長因子産生増強作用により、生体の恒常性の維持に有用な機能性飲食品である。該飼料は、生物の体調改善等の効果を有し有用である。さらに、本発明により、植物由来の成長因子産生増強剤も提供され、該増強剤は成長因子の機能研究、成長因子に関連する疾患用医薬のスクリーニングに有用である。

## 請求の範囲

1. 植物由来の成長因子産生増強物質を有効成分として含有してなることを特徴とする成長因子産生増強用組成物。

2. セリ科、キク科、ユリ科、イチョウ科、イネ科、バラ科、クワ科、マメ科、シナノキ科、アブラナ科及びショウガ科に属する植物からなる群より選択される1以上の植物由来の成長因子産生増強物質を有効成分として含有してなる請求項1記載の成長因子産生増強用組成物。

3. 植物由来の成長因子産生増強物質がクロロゲン酸(chlorogenic acid)、ジカフェオイルキナ酸(dicaffeoyl-quinic acid)、カフェオイルキナ酸(caffeoyl-quinic acid)、イソオリエンチン(isoorientin)、サフロミンA(safflomin A)、グアイアノライド(guaianolide)、キサントアンゲロール(xanthoangelol)、3'-O- $\beta$ -D-グルコピラノイル ケラクトン(3'-O- $\beta$ -D-glucopyranoyl khellactone)、7-O- $\beta$ -D-グルコピラノシルオキシ-8-プレニルクマリン(7-O- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-8-prenylcoumarin)、コーヒー酸メチルエステル(caffeic acid methyl ester)、コーヒー酸エチルエステル(caffeic acid ethyl ester)、8-カルボキシル-3-ヒドロキシ-5-メトキシル-2-ジメチルクロマン(8-carboxyl-3-hydroxy-5-methoxyl-2-dimethylchroman)、7- $\beta$ -D-グルコピラノシルオキシ-6-プレニルクマリン(7- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-6-prenylcoumarin)、4'-O-アンゲロイル-3'-O-[6-O-( $\beta$ -D-グルコピラノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル]-ケラクトン(4'-O-angeloyl-3'-O-[6-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-khellactone)、イソキサントフモール(isoxanthohumol)、キサントフモールB(xanthohumol B)、キサントフモールD(xanthohumol D) 及びキサントフモール(xanthohumol)。

ol) からなる群より選択される 1 以上の化合物である請求項 1 または 2 記載の成長因子産生増強用組成物。

4. 成長因子産生増強物質を含む、植物由来の抽出物もしくは該植物抽出物から得られる画分を含有してなる請求項 1 ～ 3 いずれか記載の成長因子産生増強用組成物。

5. 植物由来の成長因子産生増強物質を高濃度及び／又は高純度に含有してなる請求項 1 ～ 4 いずれか記載の成長因子産生増強用組成物。

6. 成長因子が肝細胞増殖因子または神経成長因子である請求項 1 ～ 5 いずれか記載の成長因子産生増強用組成物。

7. 請求項 1 ～ 6 いずれか記載の成長因子産生増強用組成物を含有してなる、成長因子産生増強を必要とする疾患の治療剤または予防剤。

8. 請求項 1 ～ 6 いずれか記載の成長因子産生増強用組成物を含有してなる成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料。

9. 植物由来の成長因子産生増強物質を高濃度及び／又は高純度に含有してなることを特徴とする食品、飲料又は飼料。

10. 植物由来の成長因子産生増強物質が、クロロゲン酸、ジカフェオイルキナ酸、カフェオイルキナ酸、イソオリエンチン、サフロミン A、ゲアイアノライド、キサントアンゲロール、3'-O-β-D-グルコピラノイル ケラクトン、7-O-β-D-グルコピラノシルオキシ-8-プレニルクマリン、コーヒー



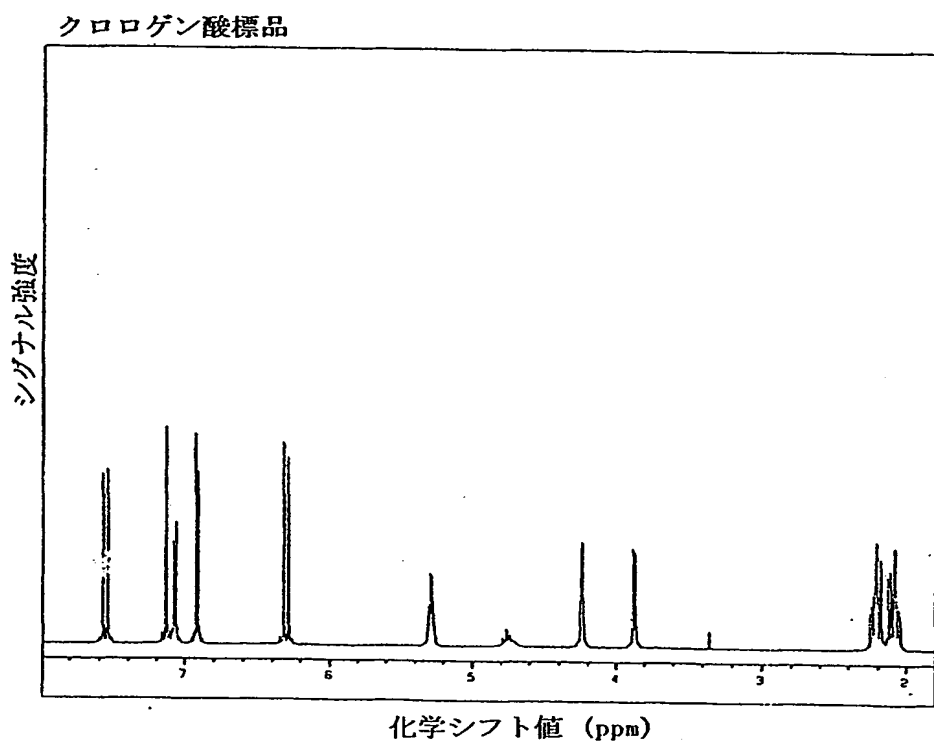
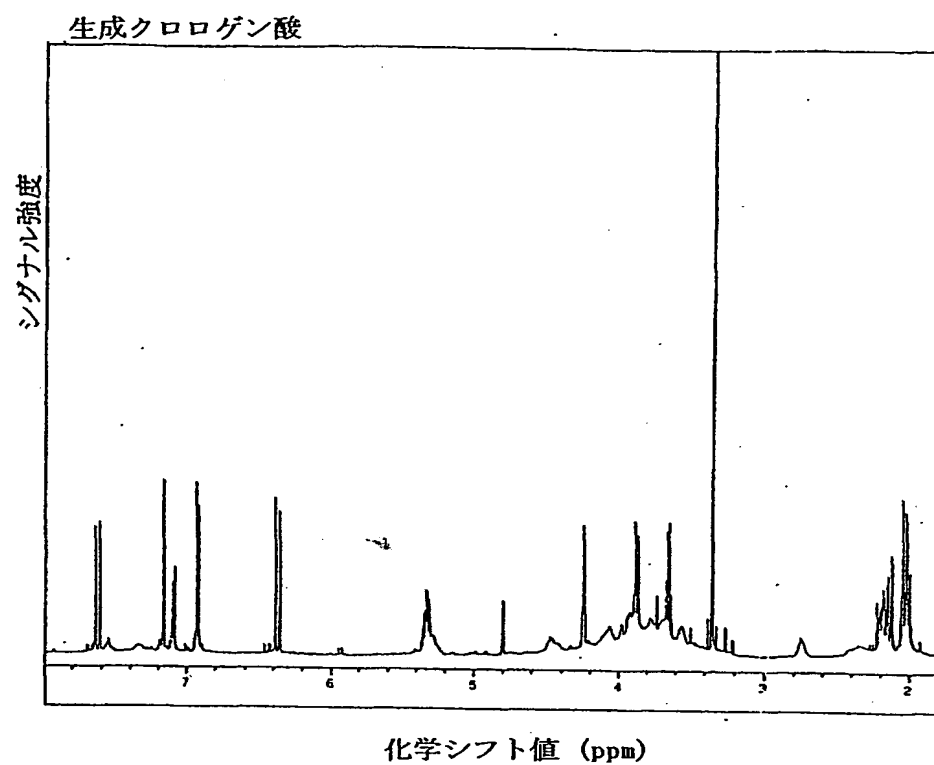
酸メチルエステル、コーヒー酸エチルエステル、8-カルボキシル-3-ヒドロキシ-5-メトキシル-2-ジメチルクロマン、7-β-D-グルコピラノシルオキシ-6-プレニルクマリン、4'-O-アングロイル-3'-O-[6-O-(β-D-グルコピラノシル)-β-D-グルコピラノシル]-ケラクトン、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールDおよびキサントフモールからなる群より選択される1以上の化合物である請求項9記載の食品、飲料又は飼料。

11. 請求項1～6いずれか記載の成長因子産生増強用組成物を高濃度及び／又は高純度に含有してなる食品、飲料又は飼料。

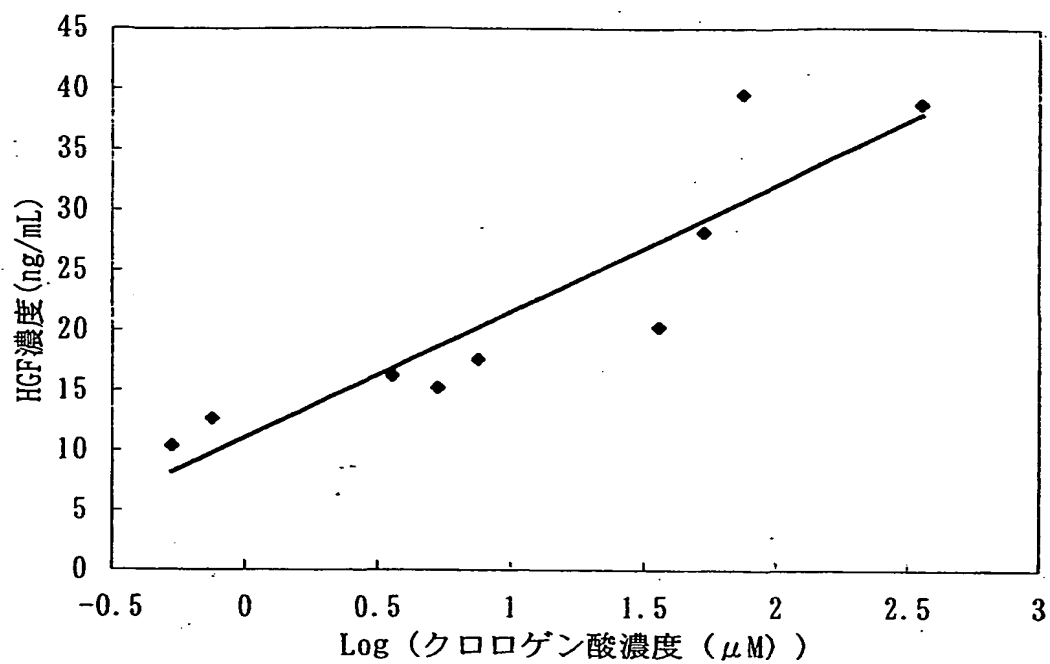
12. 植物由来の成長因子産生増強用組成物がクロロゲン酸、ジカフェオイルキナ酸、カフェオイルキナ酸、イソオリエンチン、サフロミンA、グアイアノライド、キサントアングロール、3'-O-β-D-グルコピラノイル ケラクトン、7-O-β-D-グルコピラノシルオキシ-8-プレニルクマリン、コーヒー酸メチルエステル、コーヒー酸エチルエステル、8-カルボキシル-3-ヒドロキシ-5-メトキシル-2-ジメチルクロマン、7-β-D-グルコピラノシルオキシ-6-プレニルクマリン、4'-O-アングロイル-3'-O-[6-O-(β-D-グルコピラノシル)-β-D-グルコピラノシル]-ケラクトン、イソキサントフモール、キサントフモールB、キサントフモールDおよびキサントフモールからなる群より選択される1以上の化合物を含有してなる組成物である請求項11記載の食品、飲料又は飼料。

13. キサントフモールを0.00007重量%以上含んでなる神経成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料。

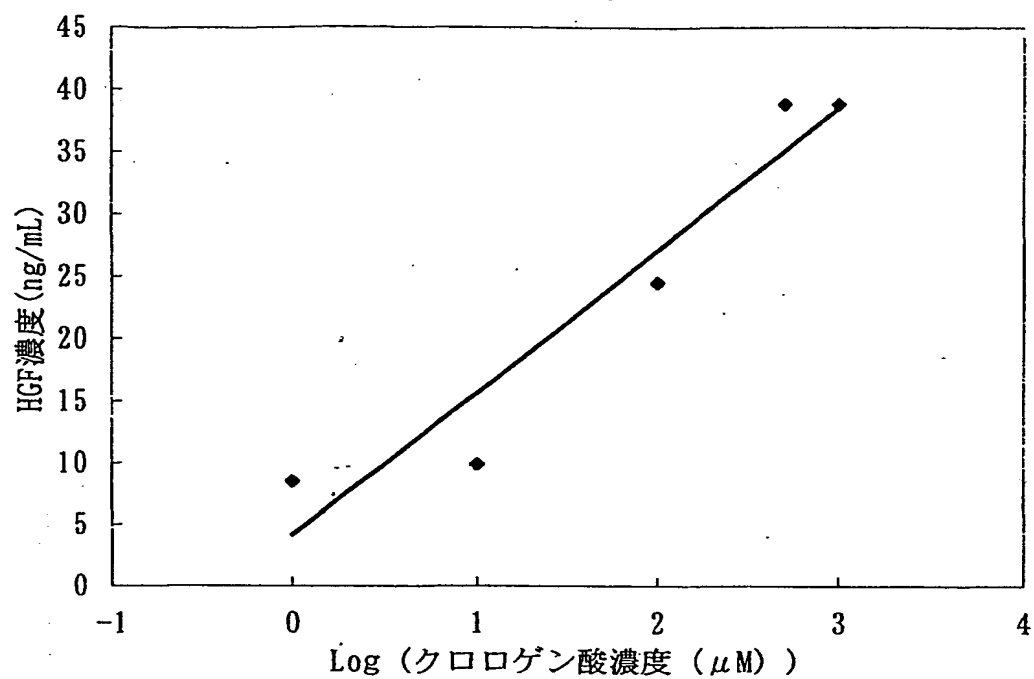
14. 成長因子産生増強物質を含有してなる食品、飲料、飼料又はそれらの処理物を含有してなる成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料。
15. ビール類を含有してなる請求項14記載の成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料。
16. ホップ抽出物を含有してなる成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料。
17. グアイアノライドを有効成分として含有してなることを特徴とする成長因子産生増強用組成物。
18. グアイアノライドを有効成分として含有してなることを特徴とする成長因子産生増強を必要とする疾患の治療剤または予防剤。
19. グアイアノライドを有効成分として含有してなることを特徴とする成長因子産生増強用の食品、飲料又は飼料。



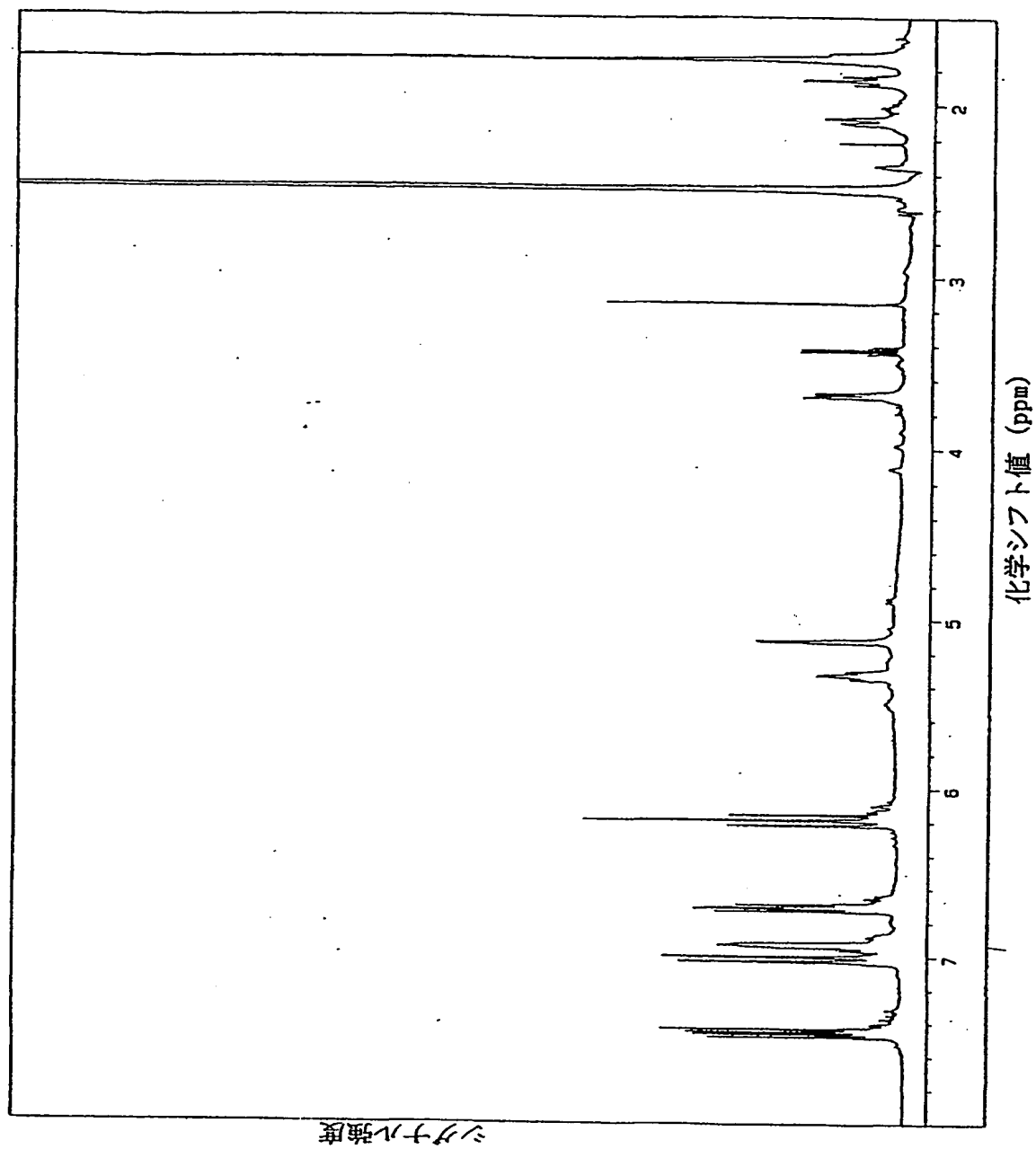
第 1 図



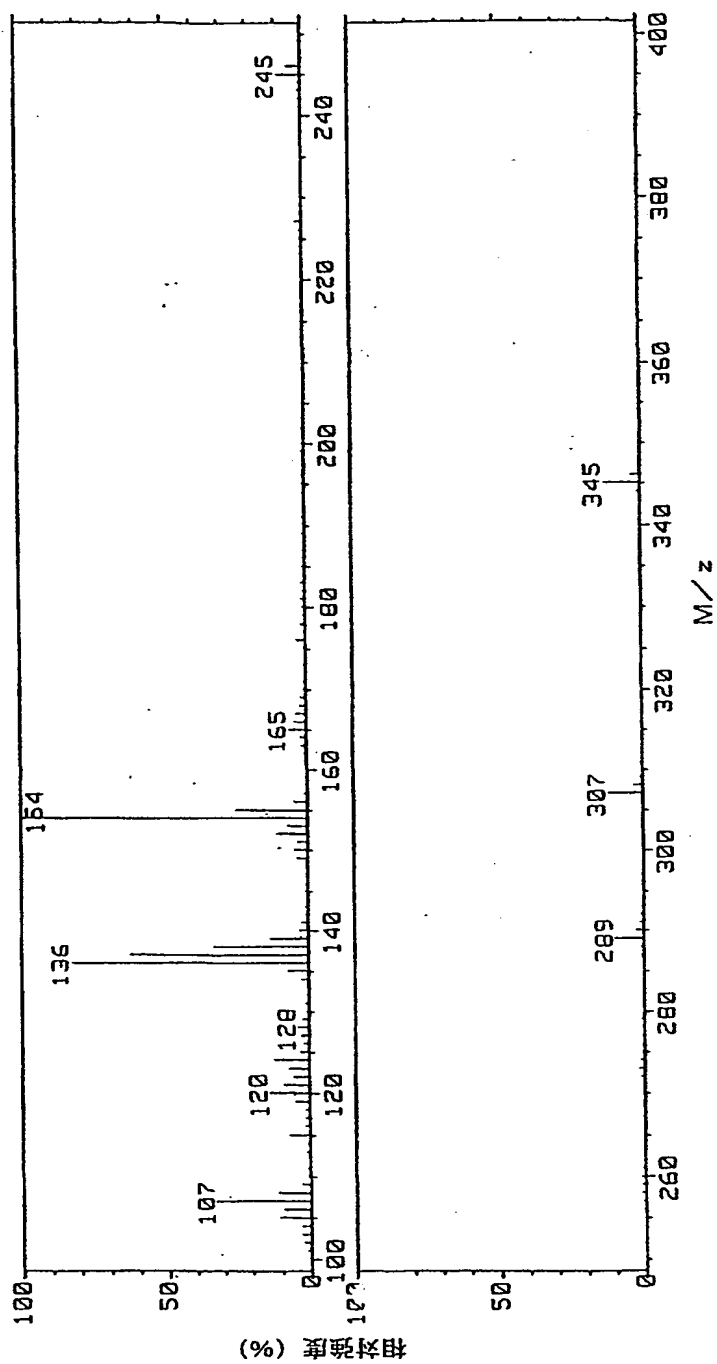
画分1～3に含まれる化合物(1)の含量とHGF産生増強能の関係



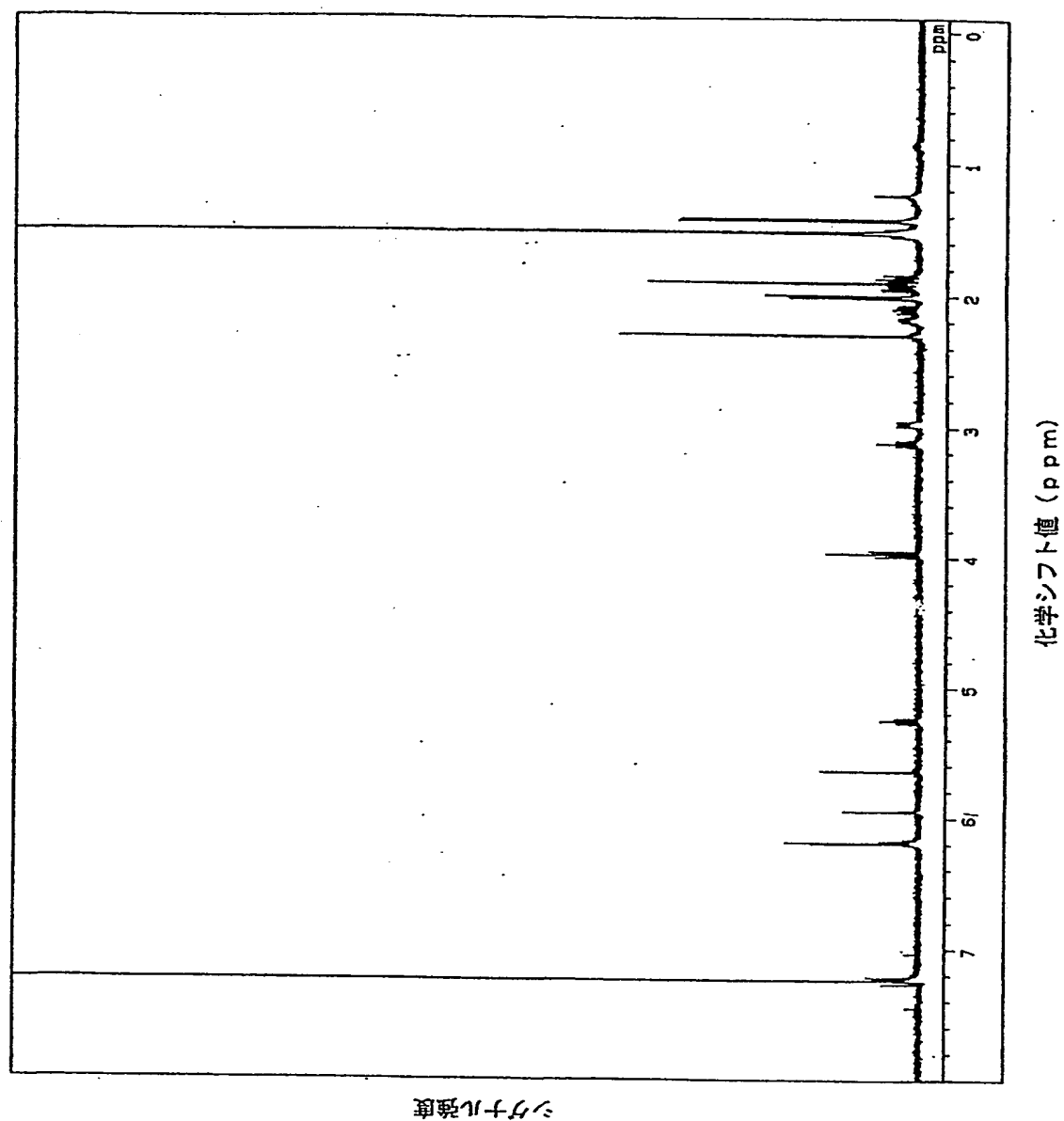
化合物 (1) 標品濃度とHGF産生増強能の関係



第4図

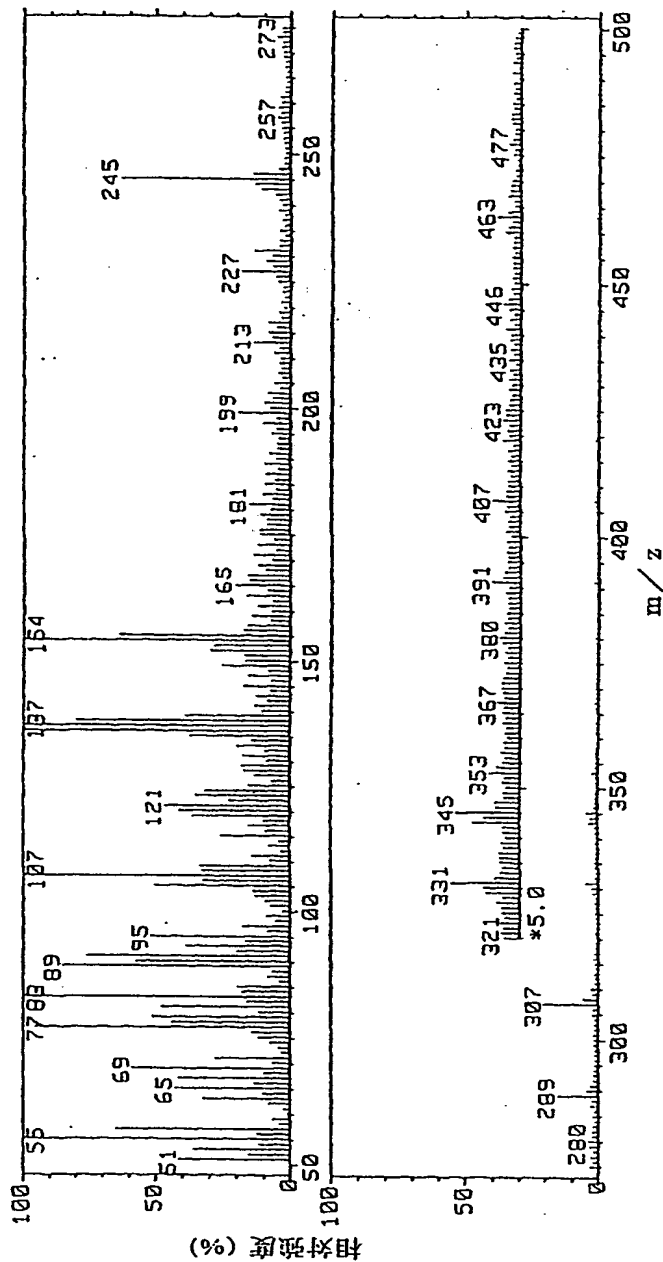


第 5 図

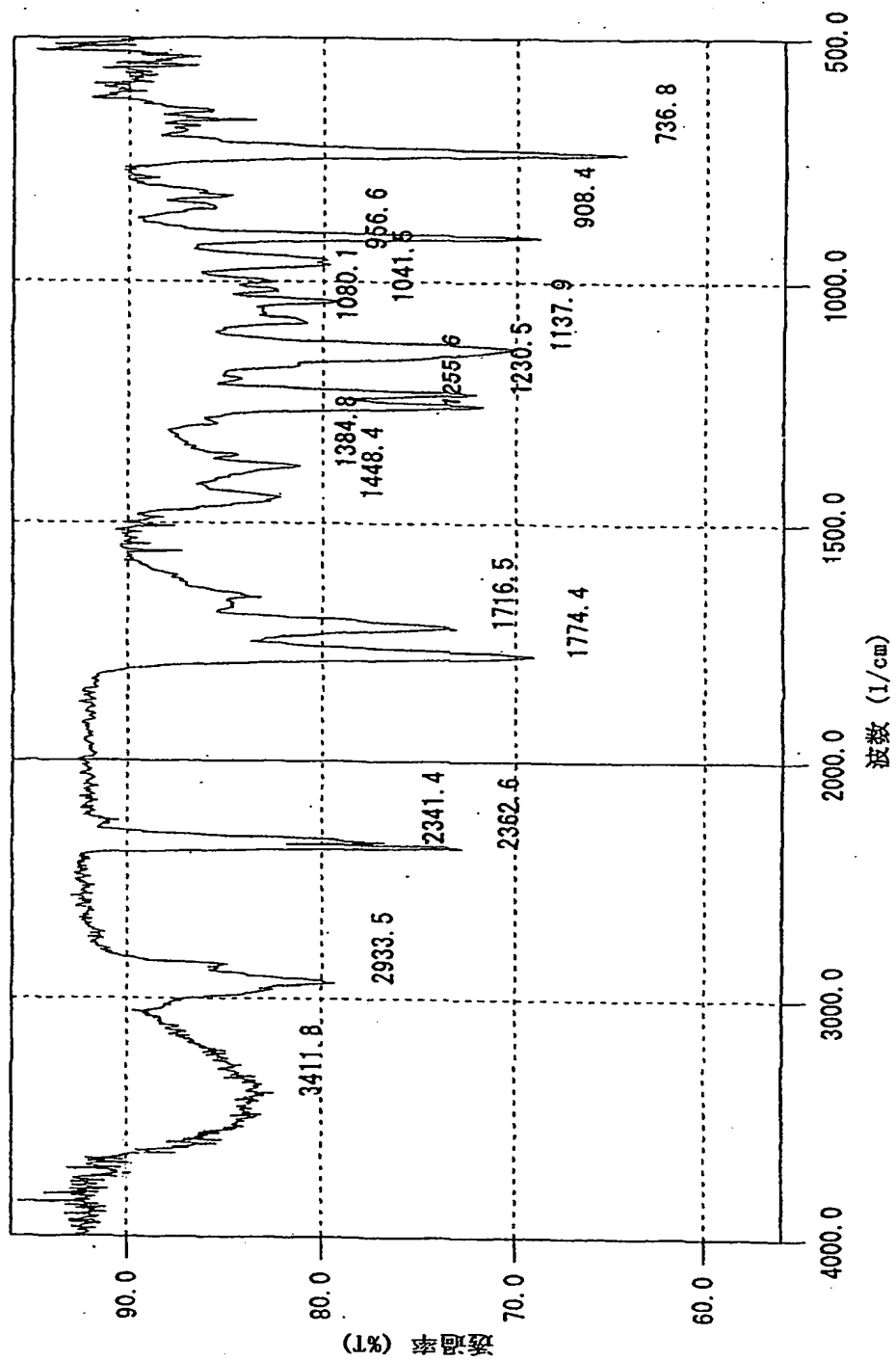


第 6 図

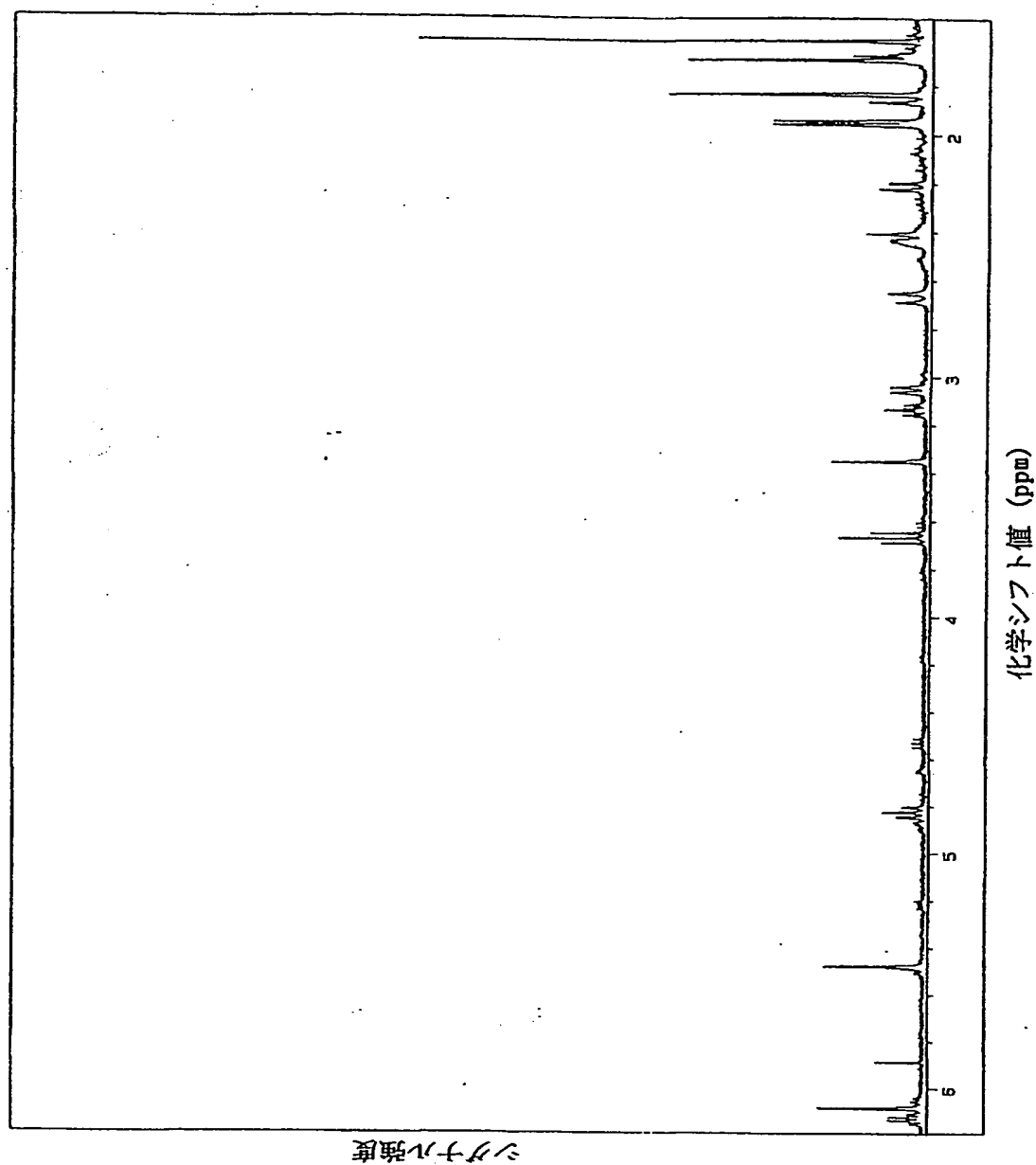




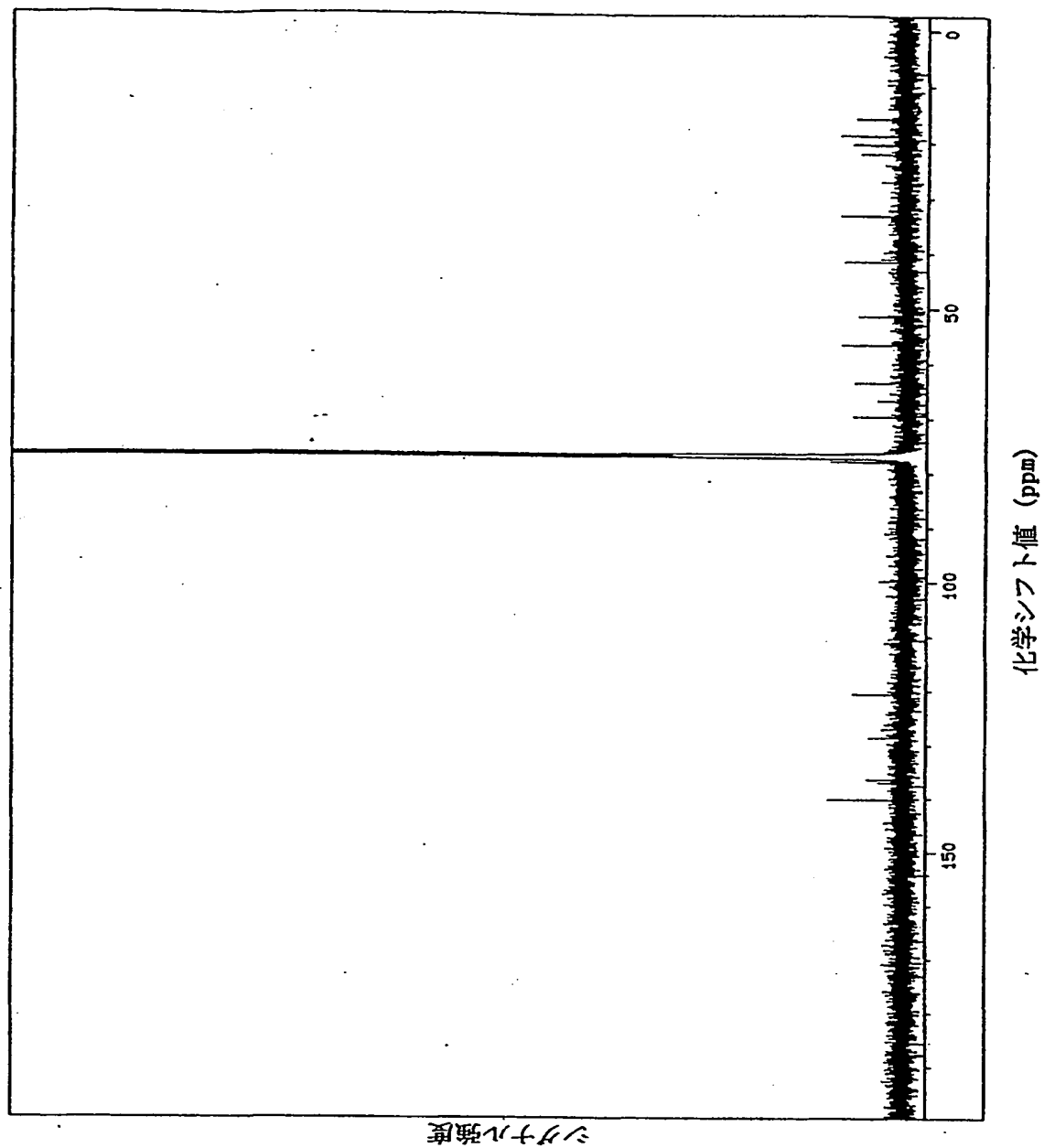
第 7 図



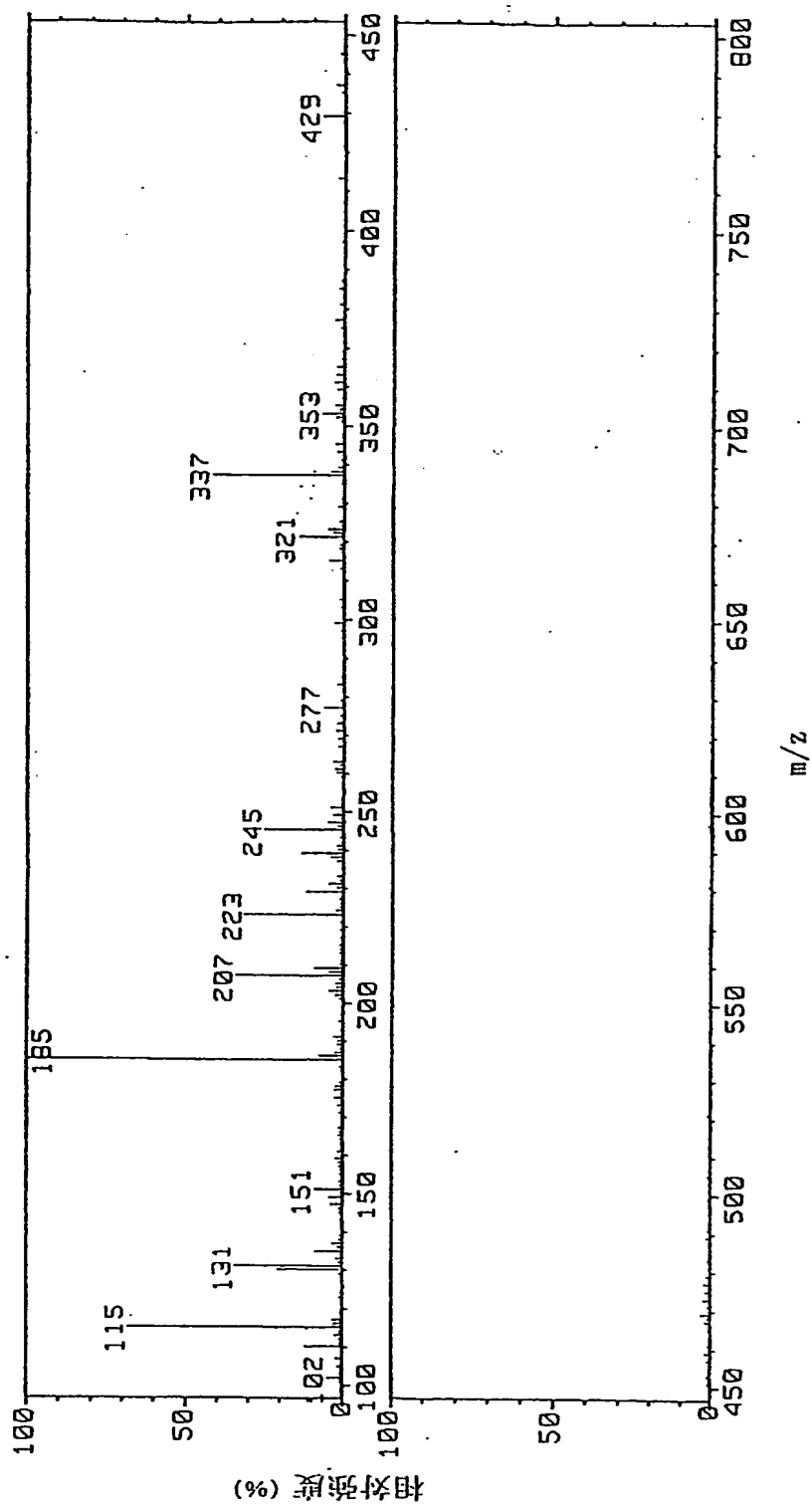
第 8 図



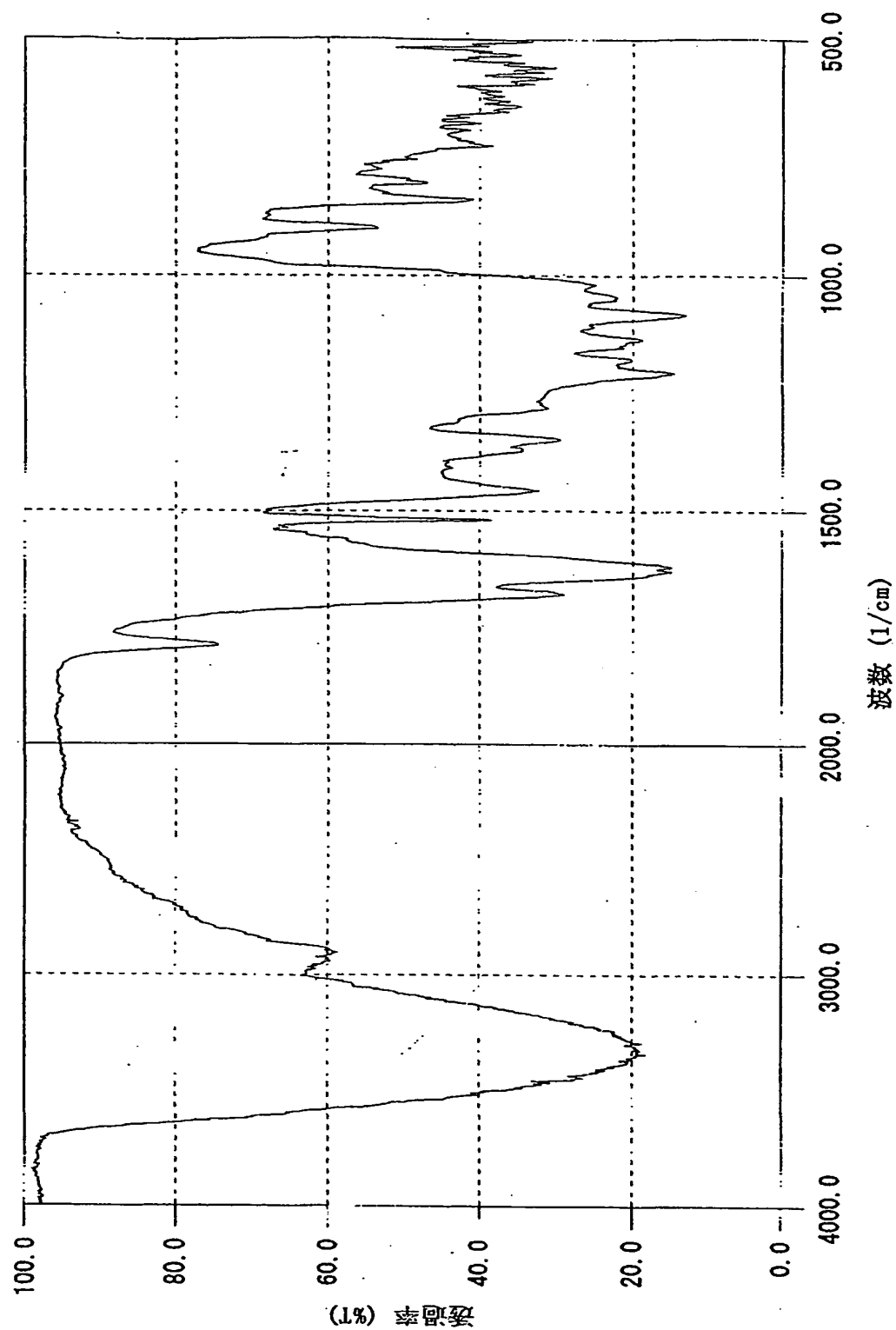
第 9 図



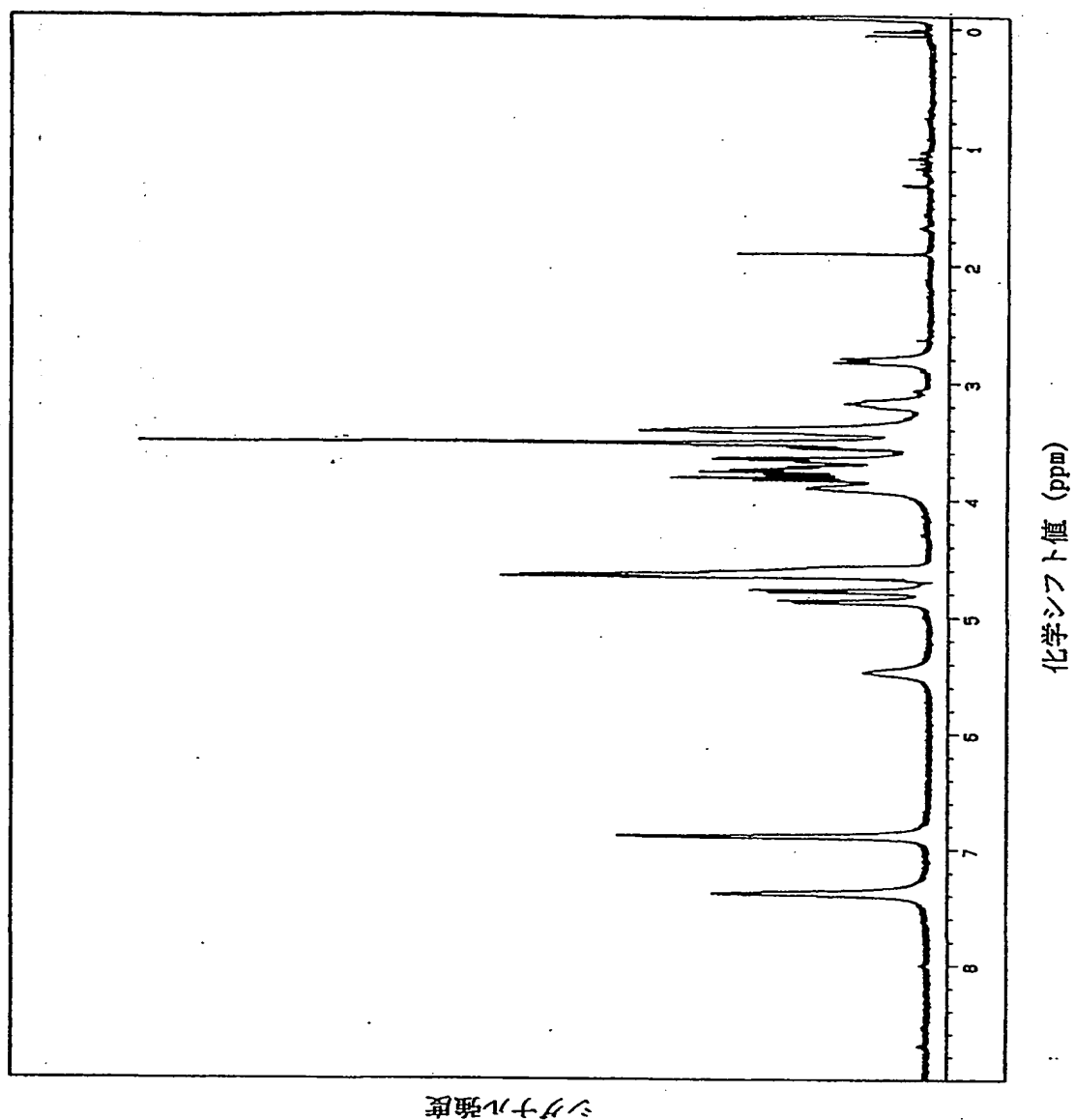
第 10 図



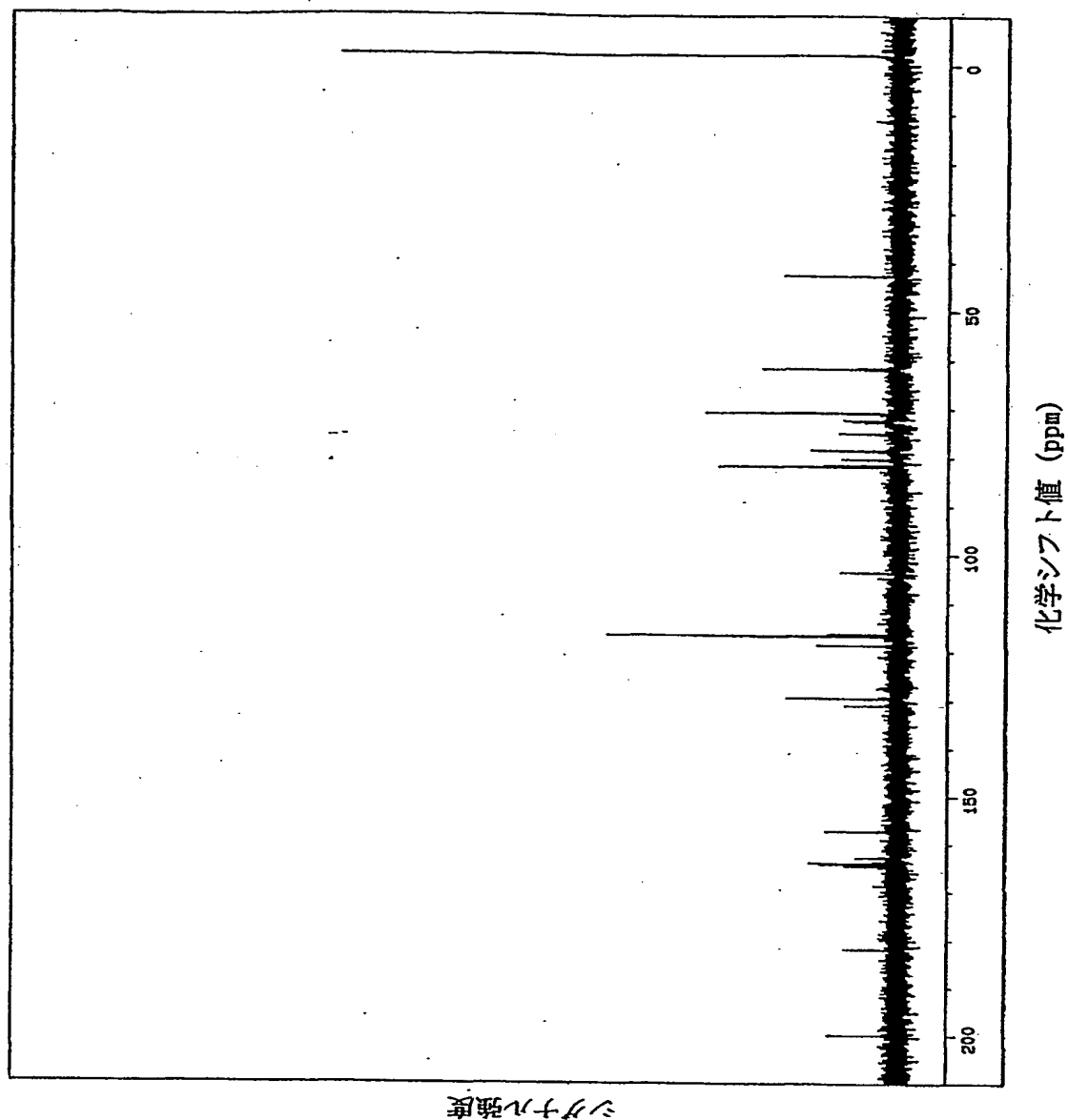
第 11 図



第 12 図

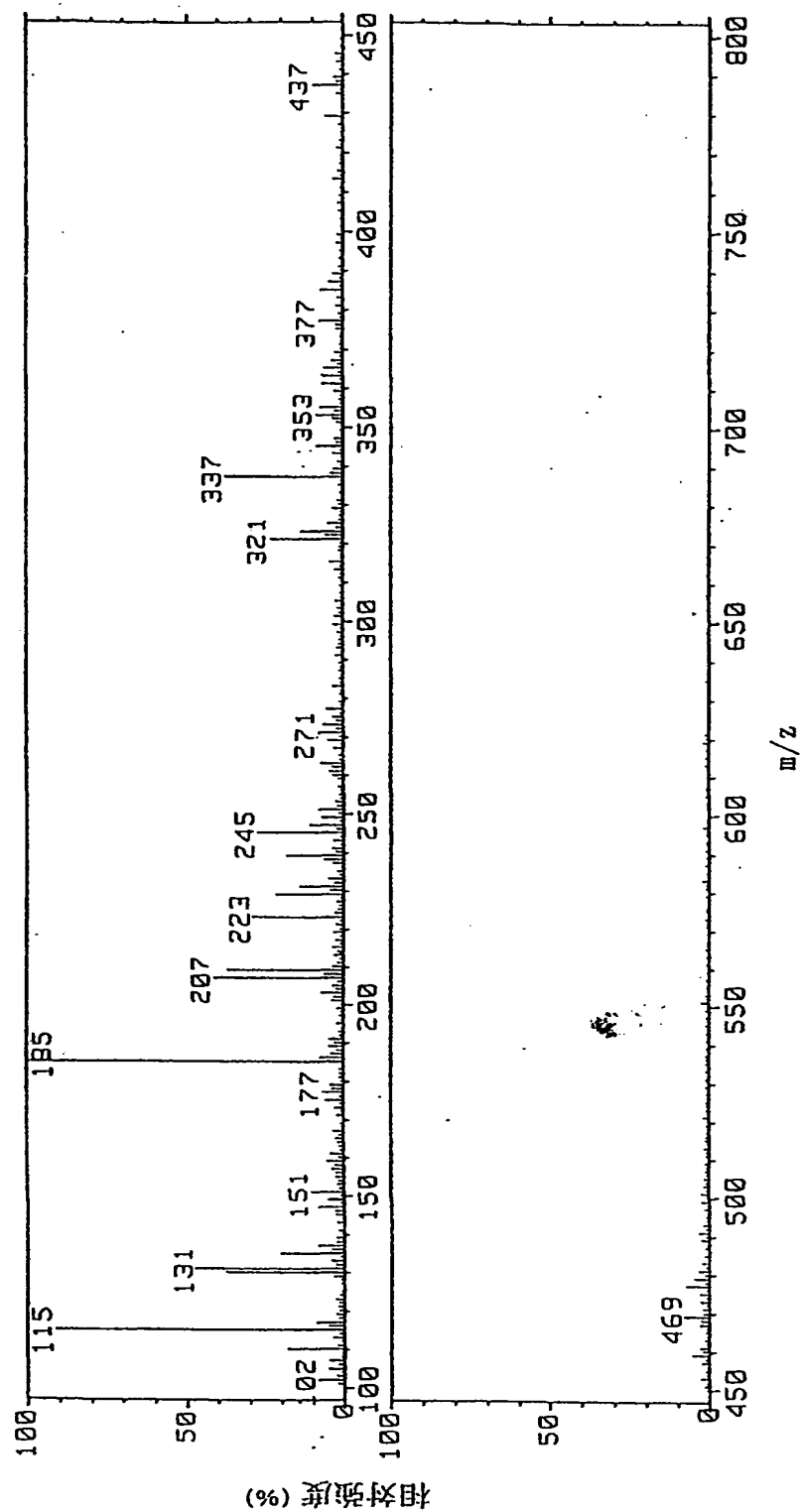


第 13 図

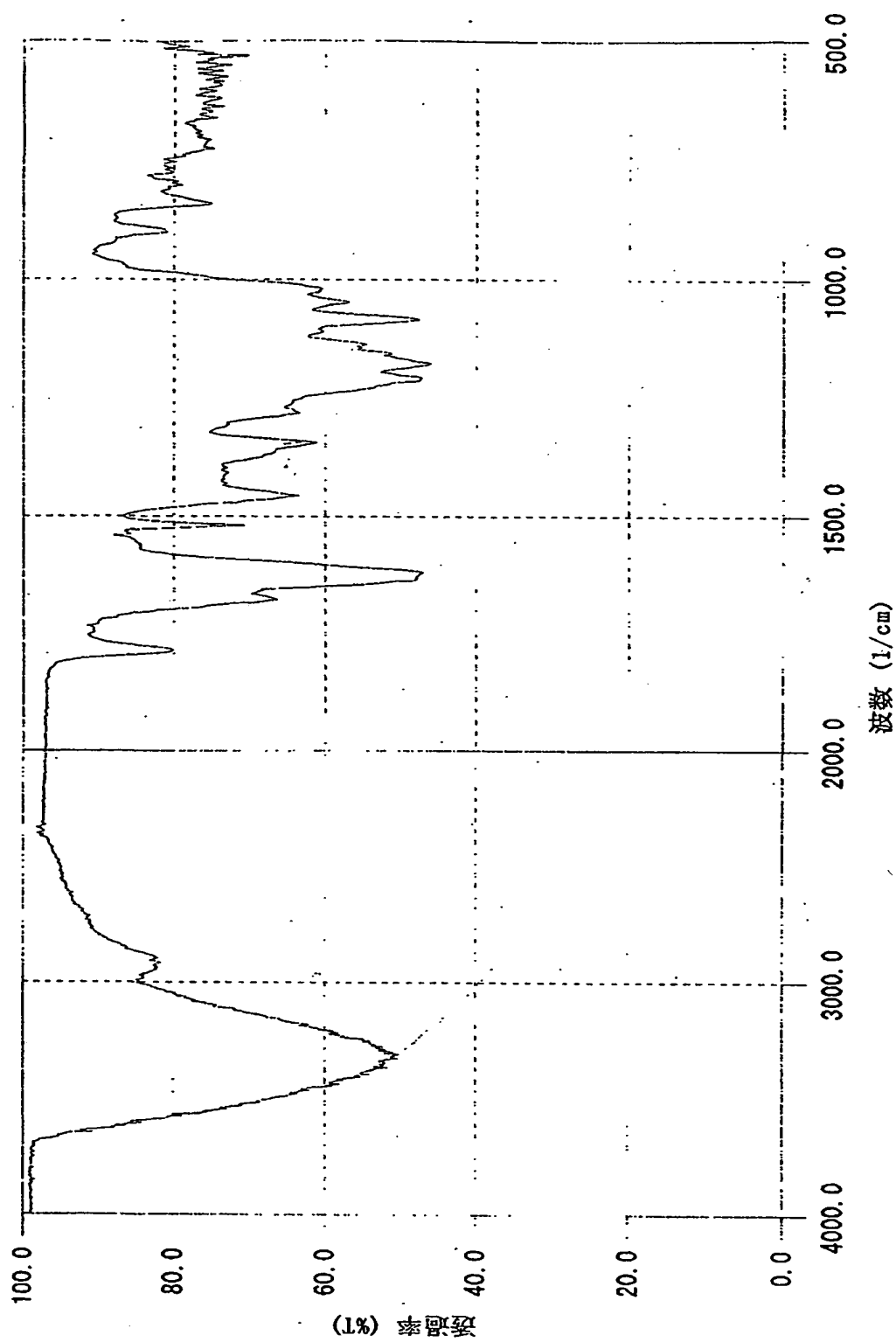


第 14 図

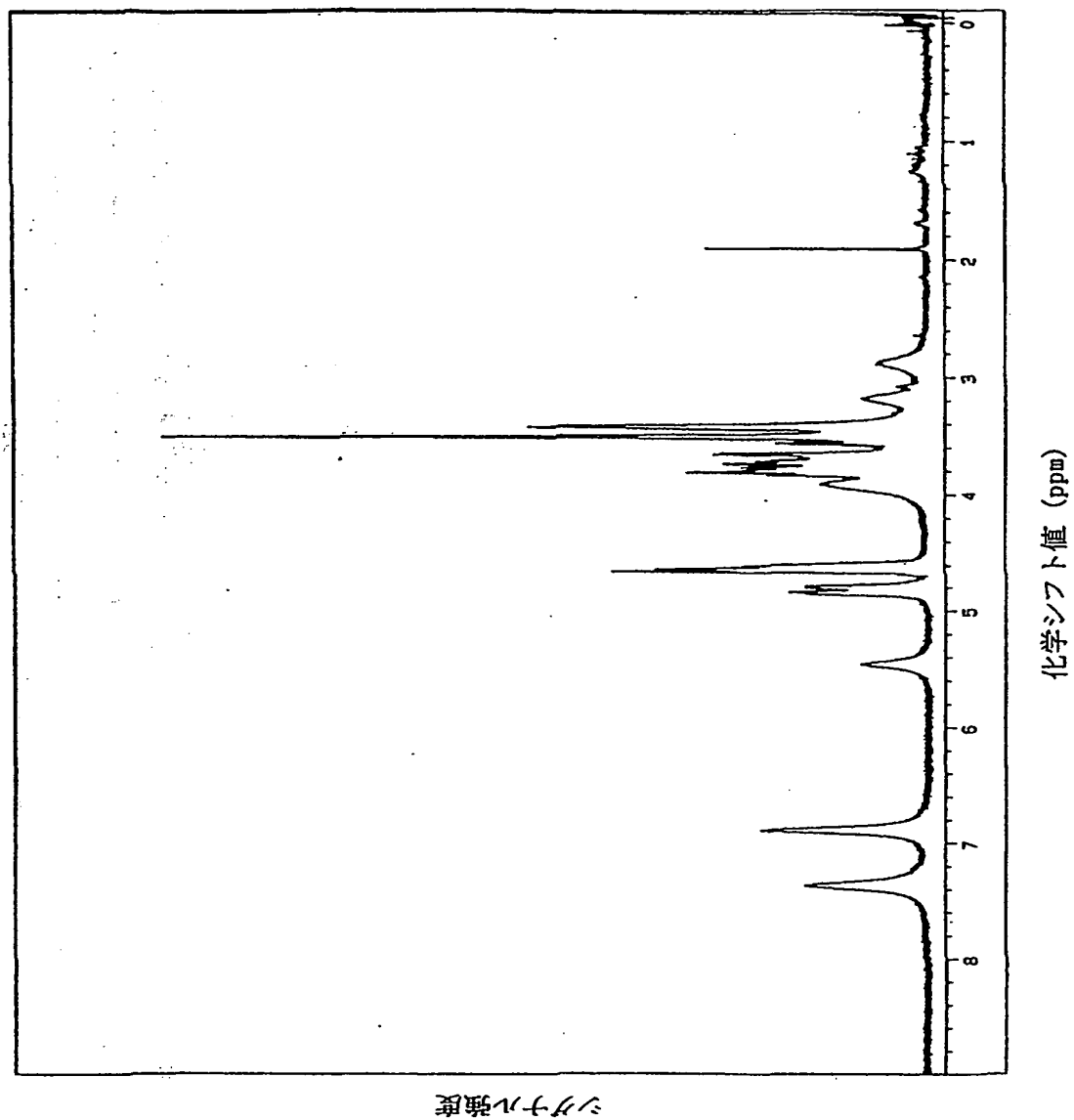




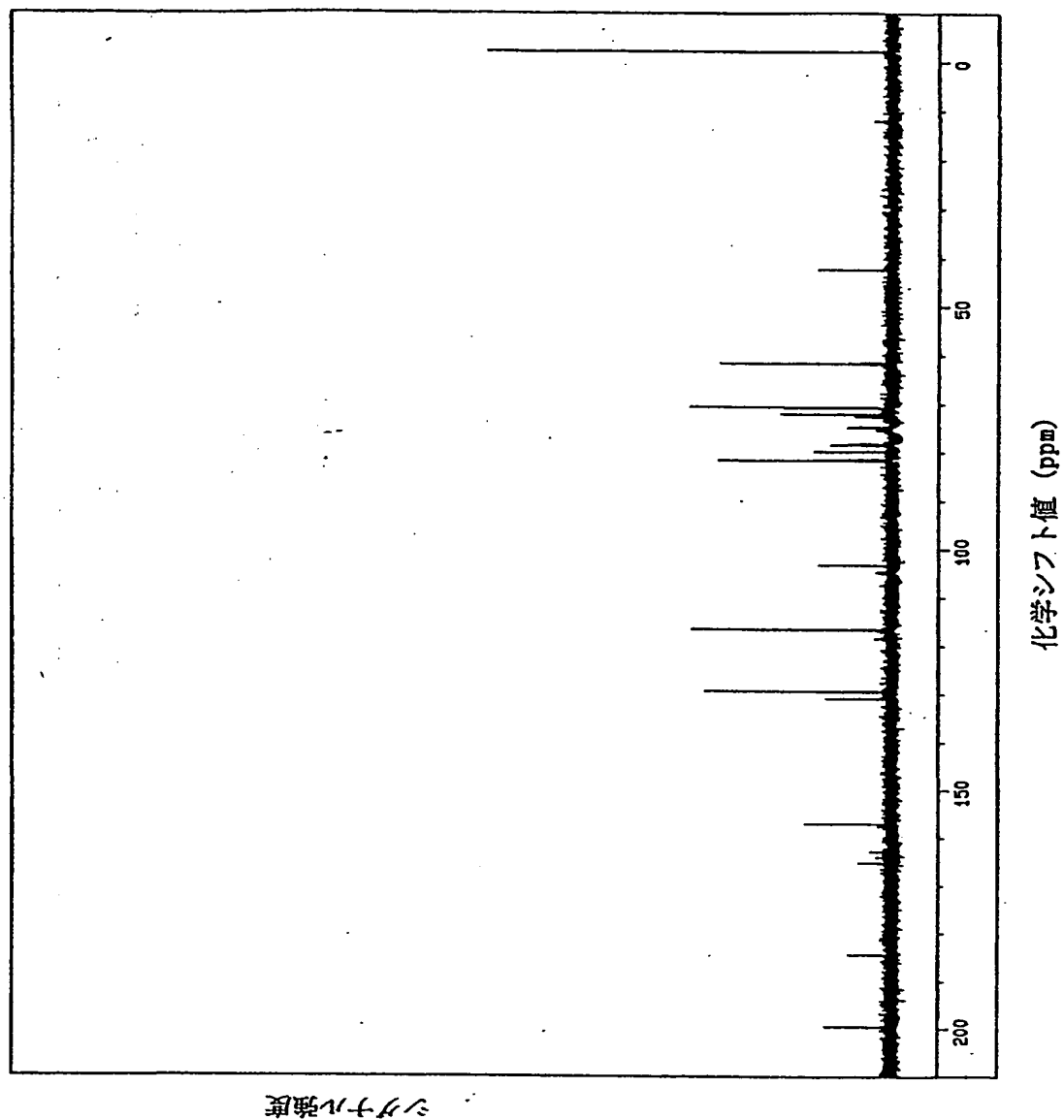
第 15 図



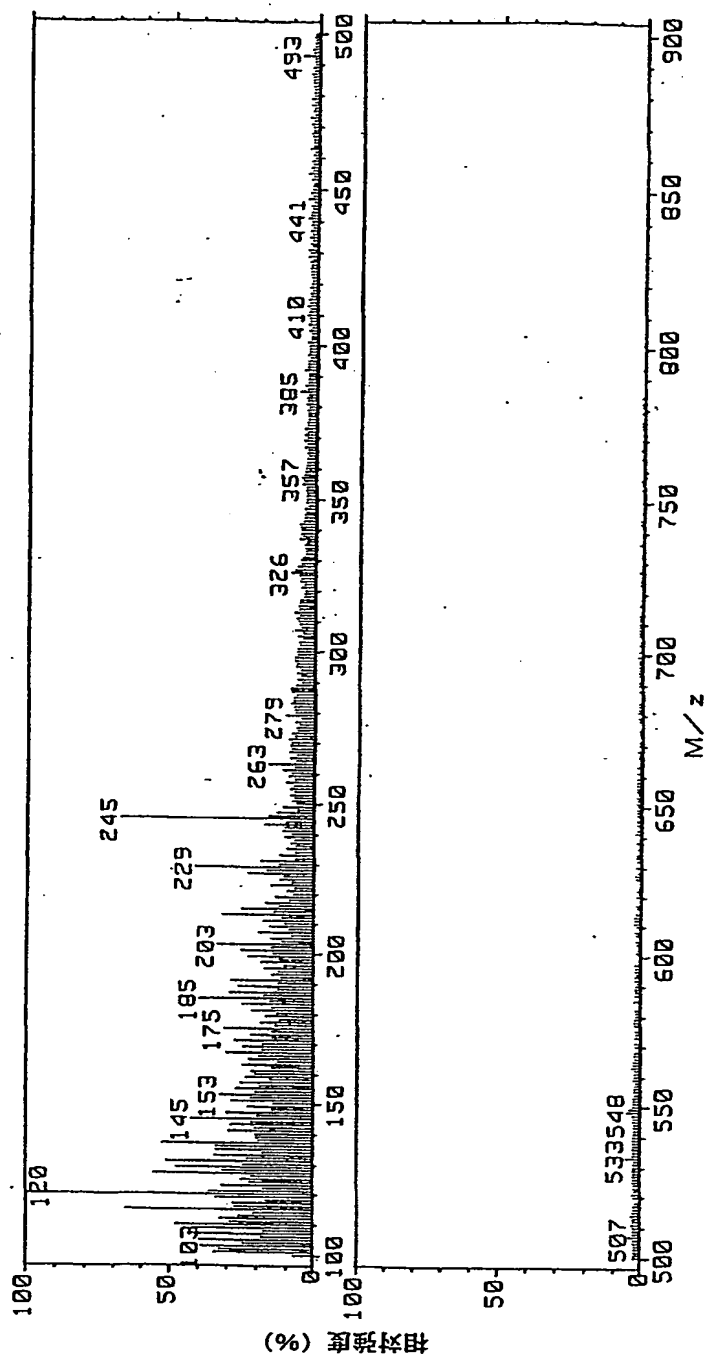
第 16 図



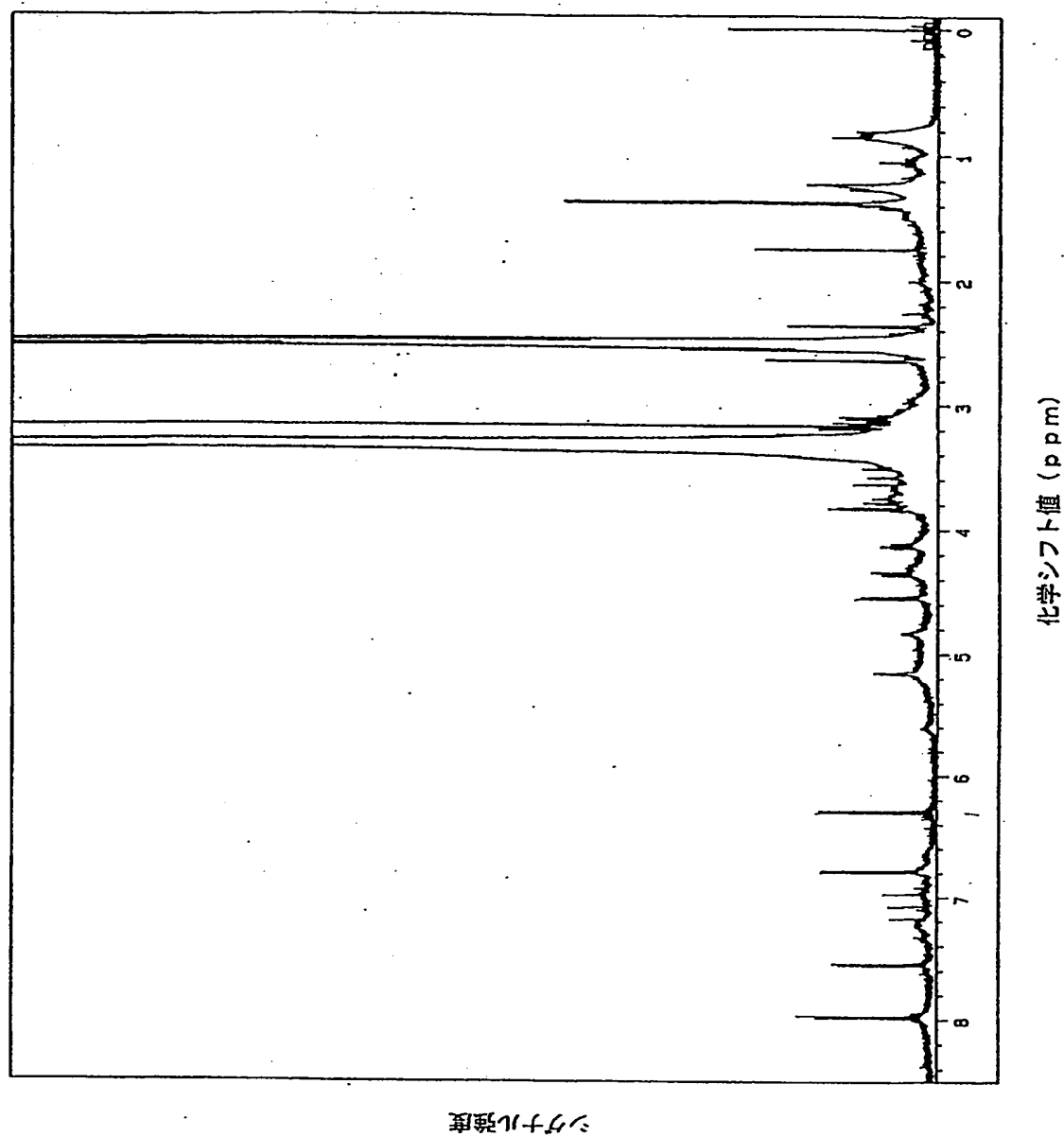
第 17 図



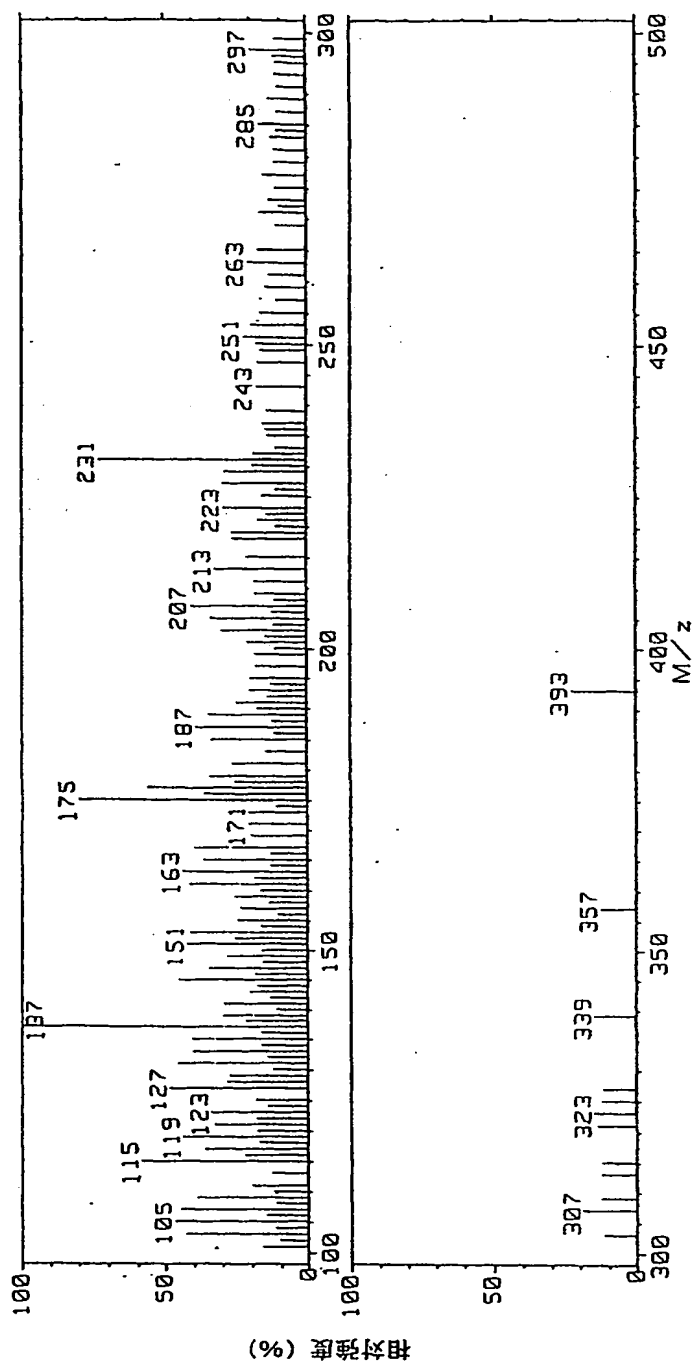
第 18 図



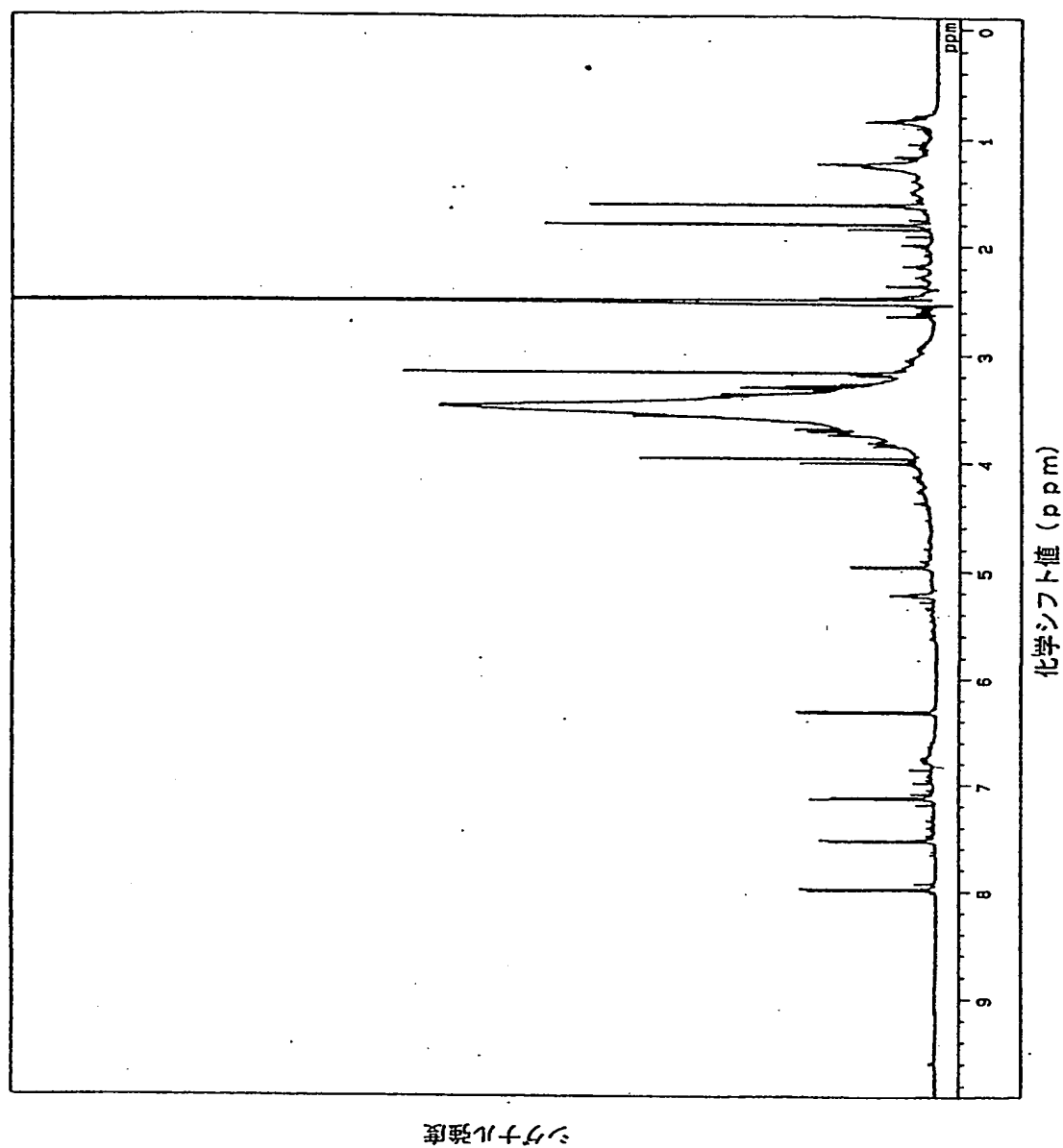
第 19 図



第 20 図

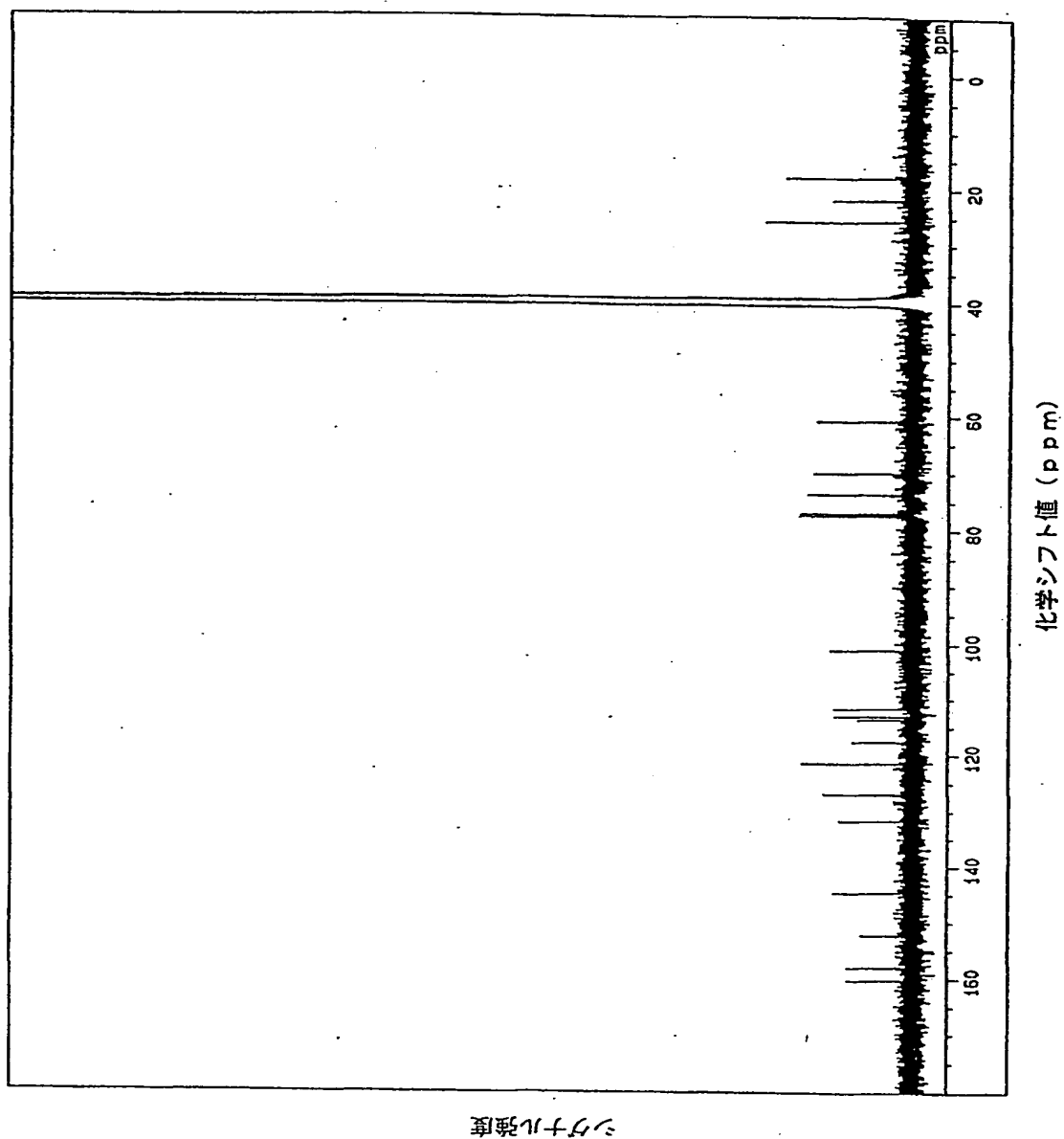


第 21 図

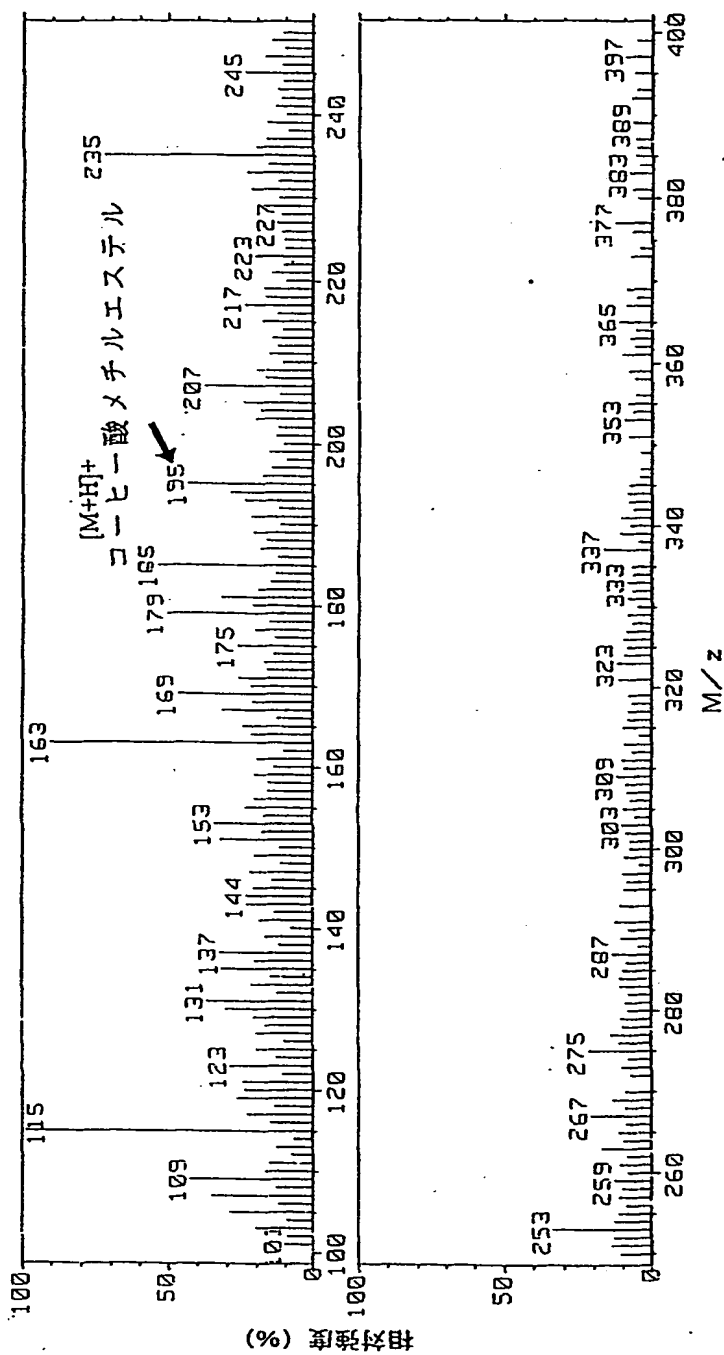


第 22 図

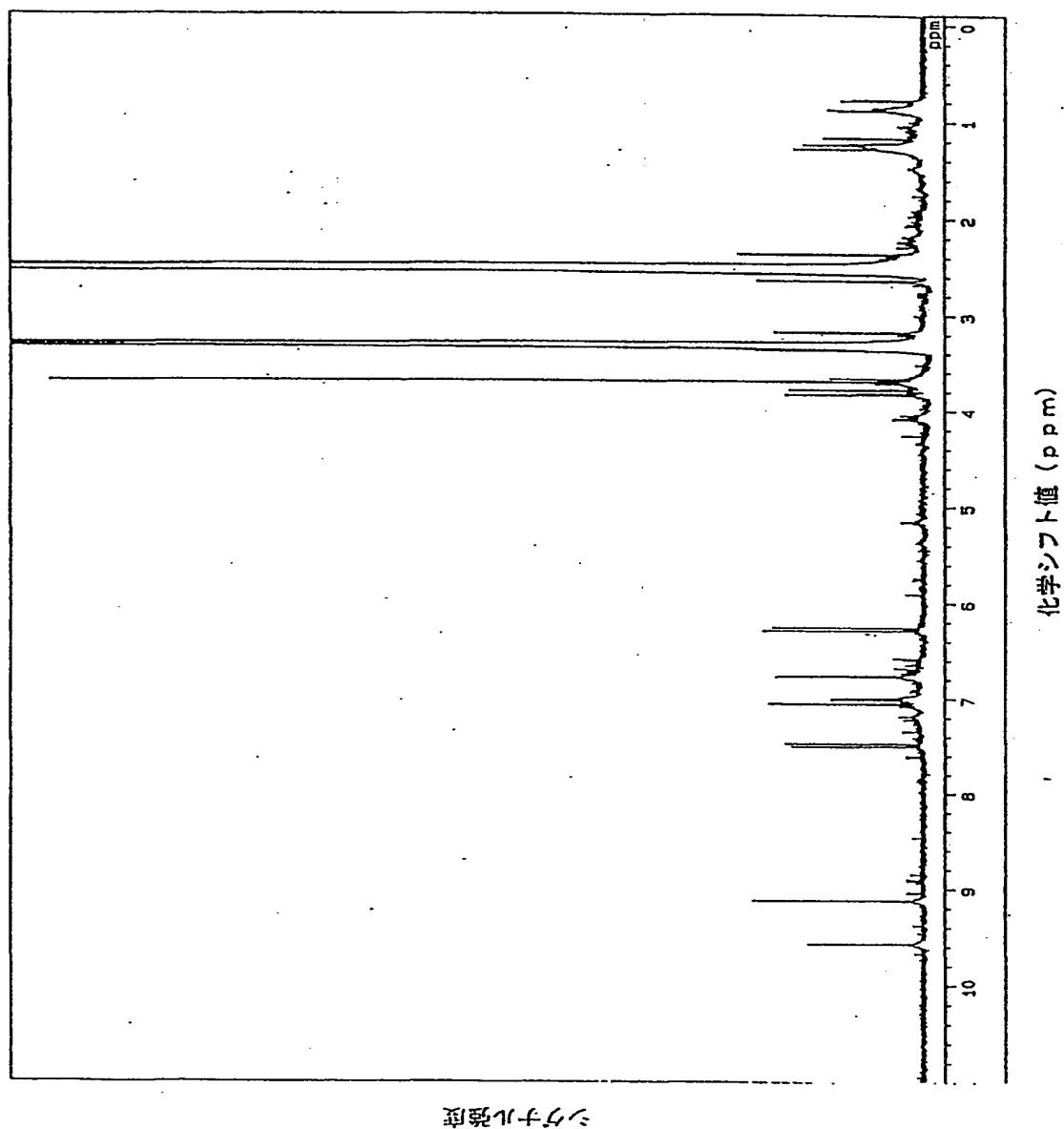




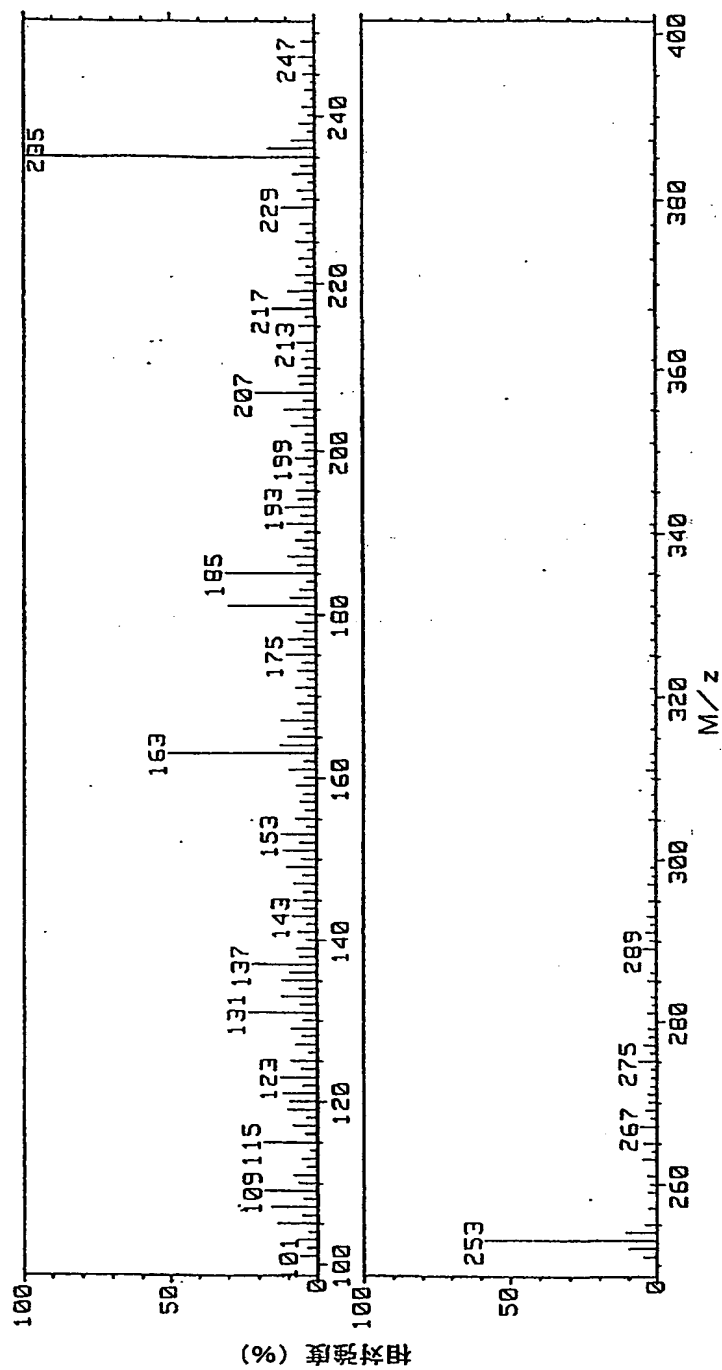
第 23 図



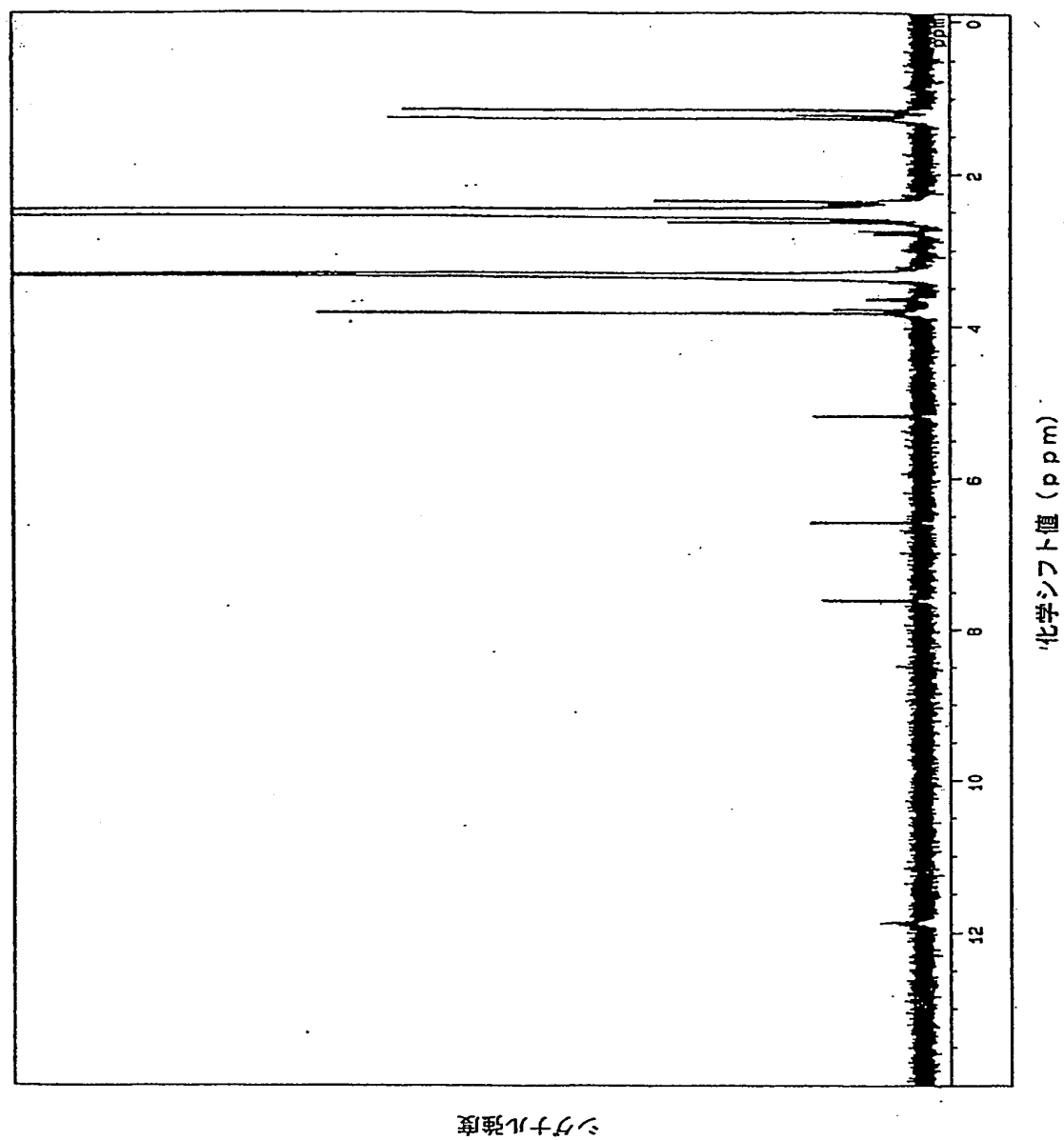
第 24 図



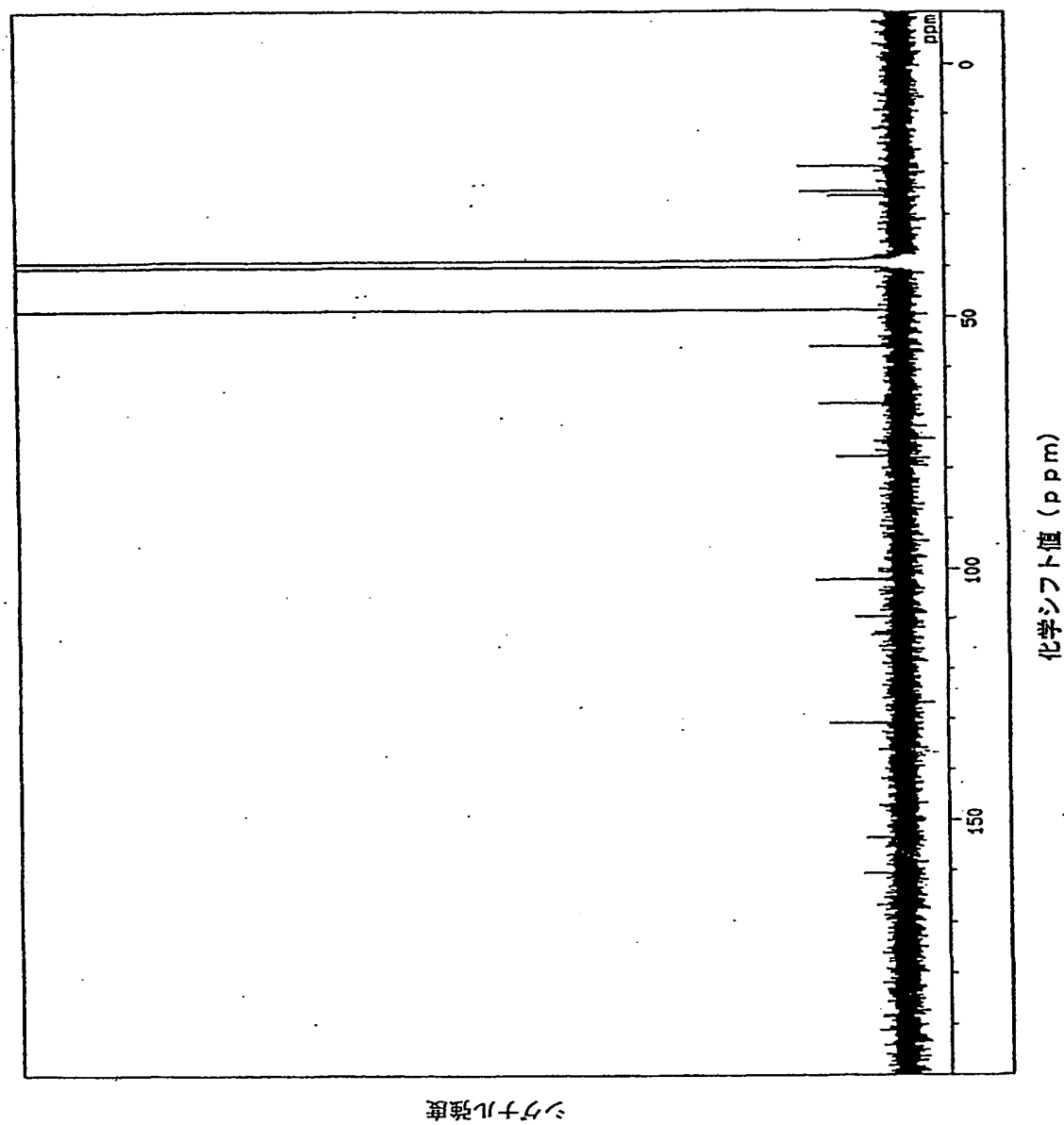
第 25 図



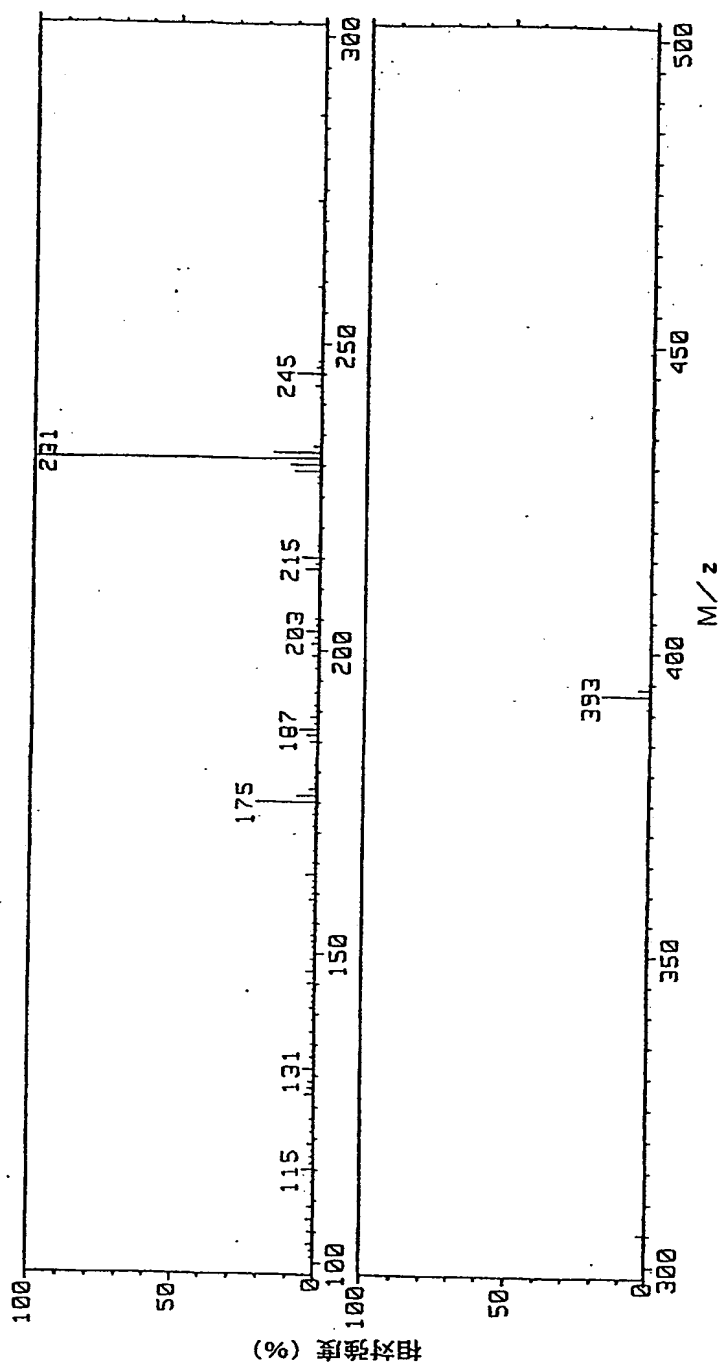
第 26 図



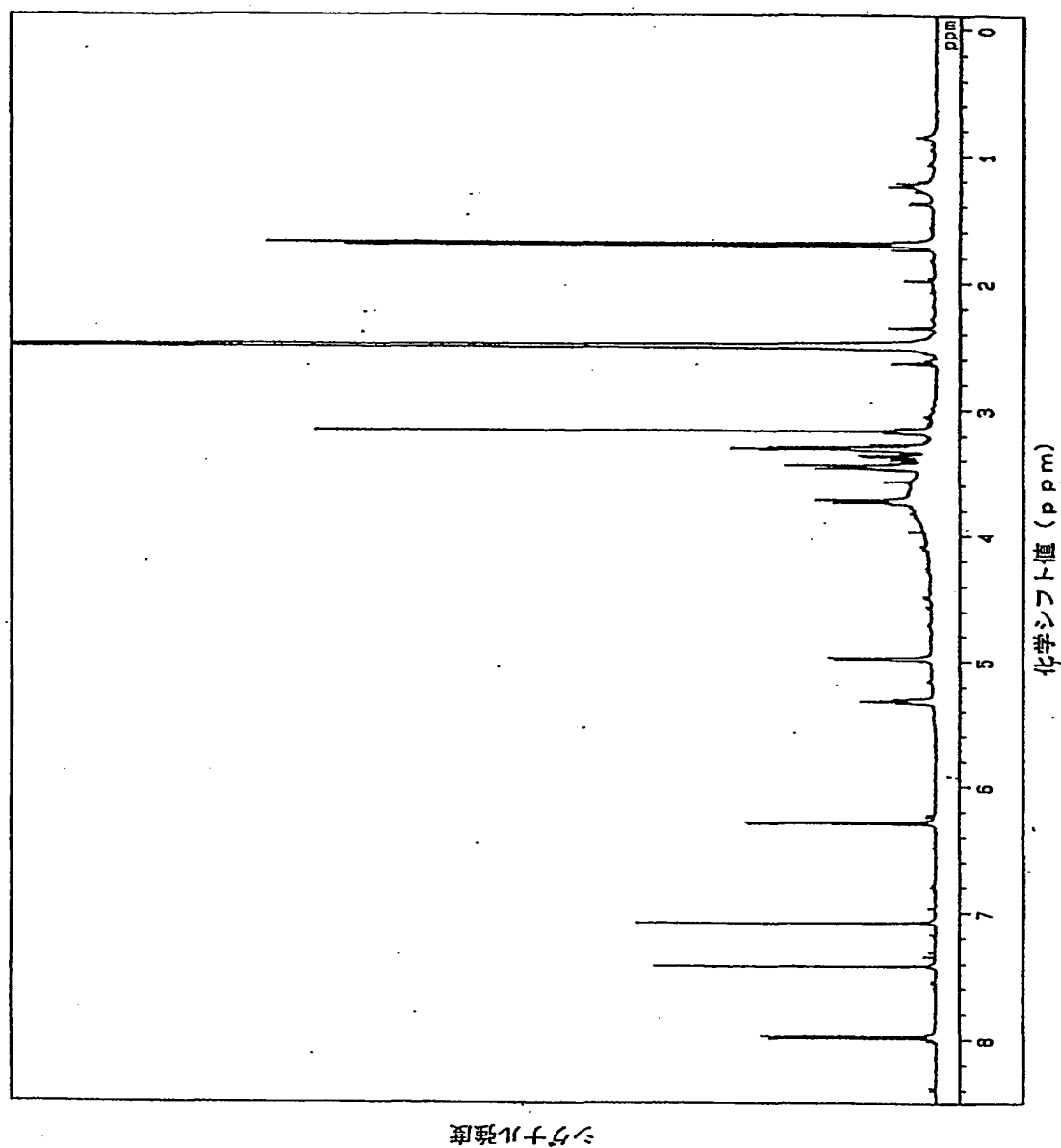
第 27 図



第 28 図

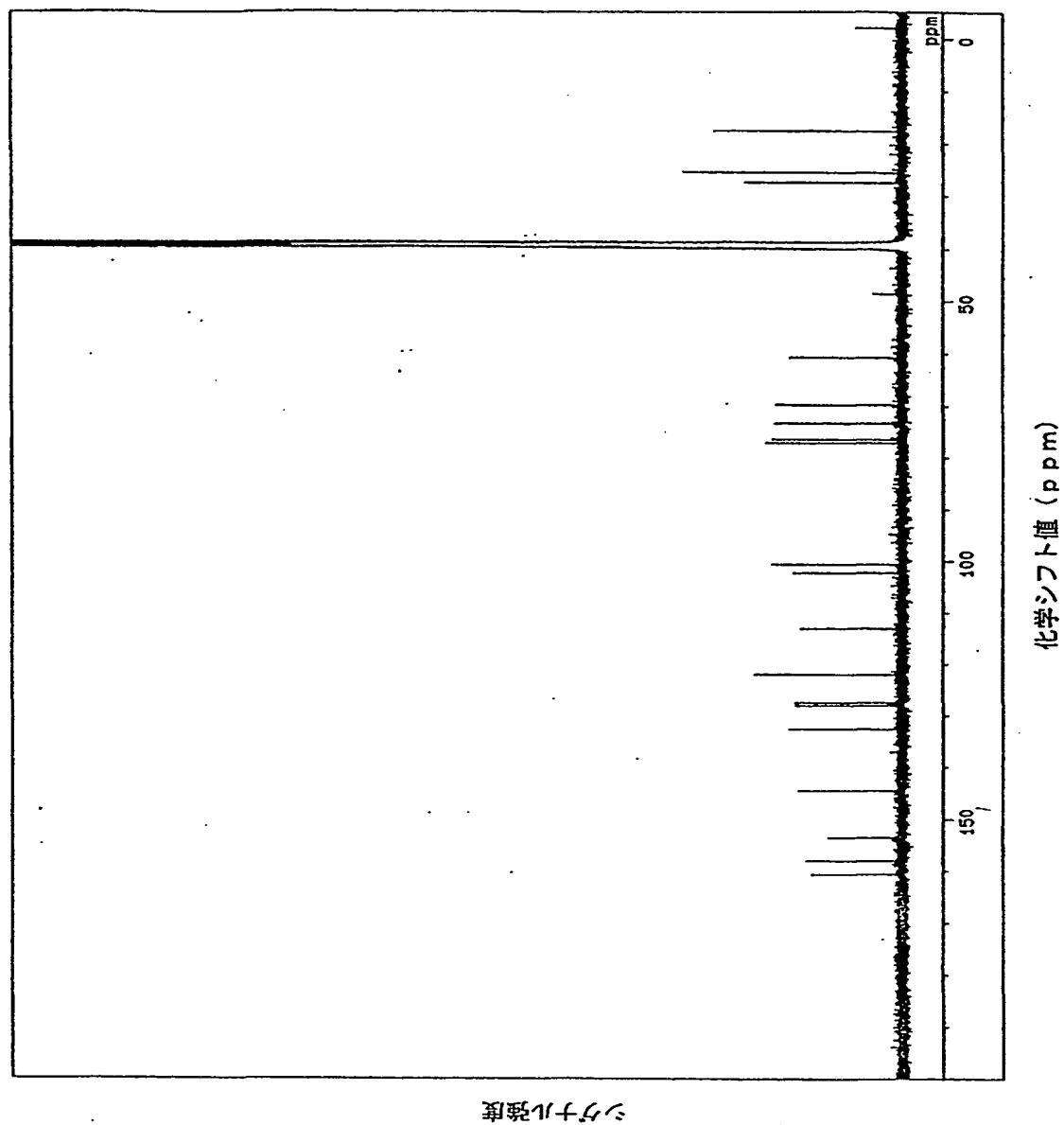


第 29 図

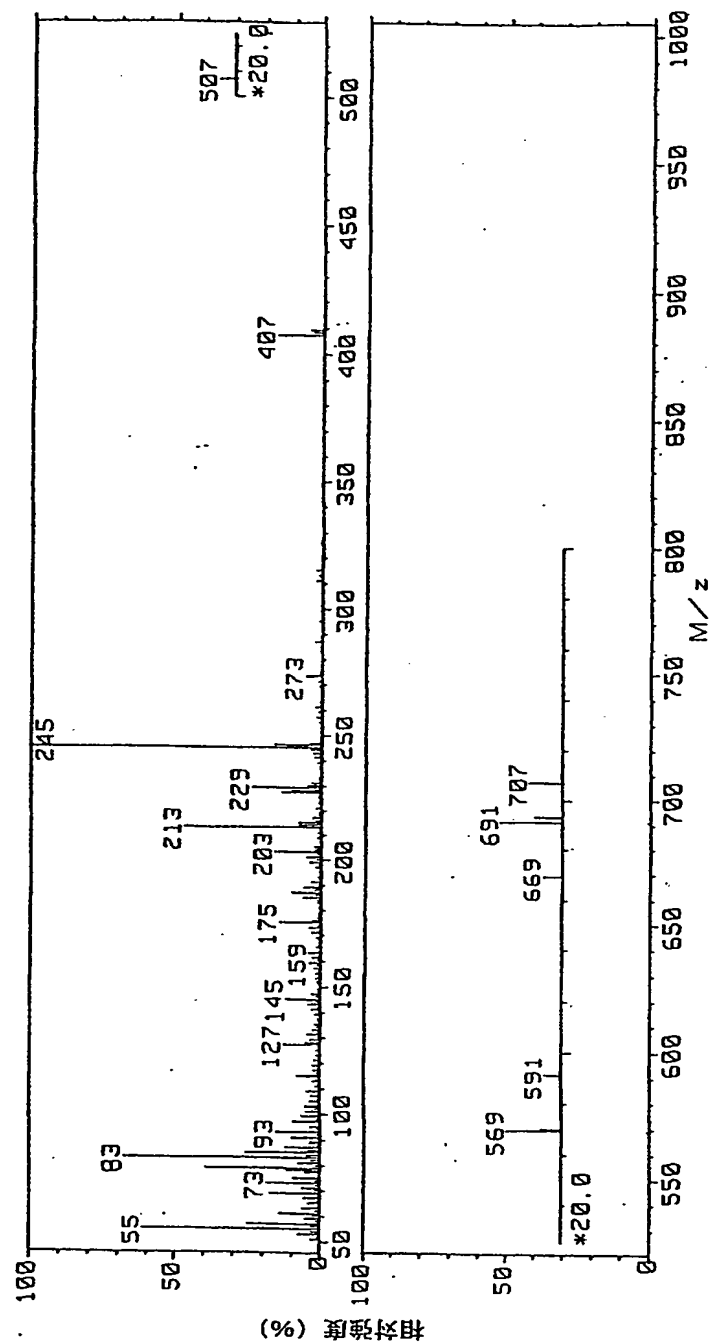


第 30 図

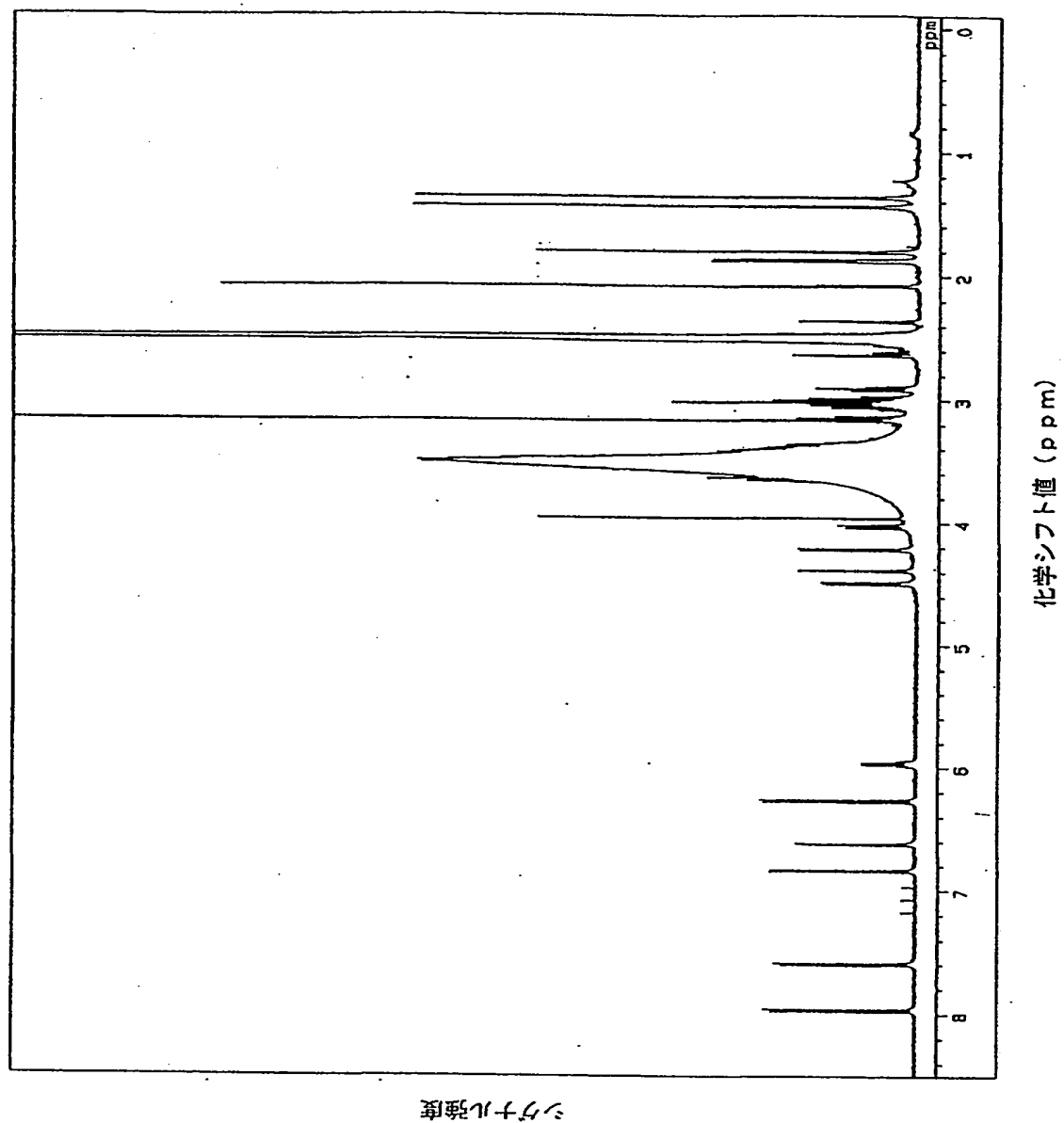




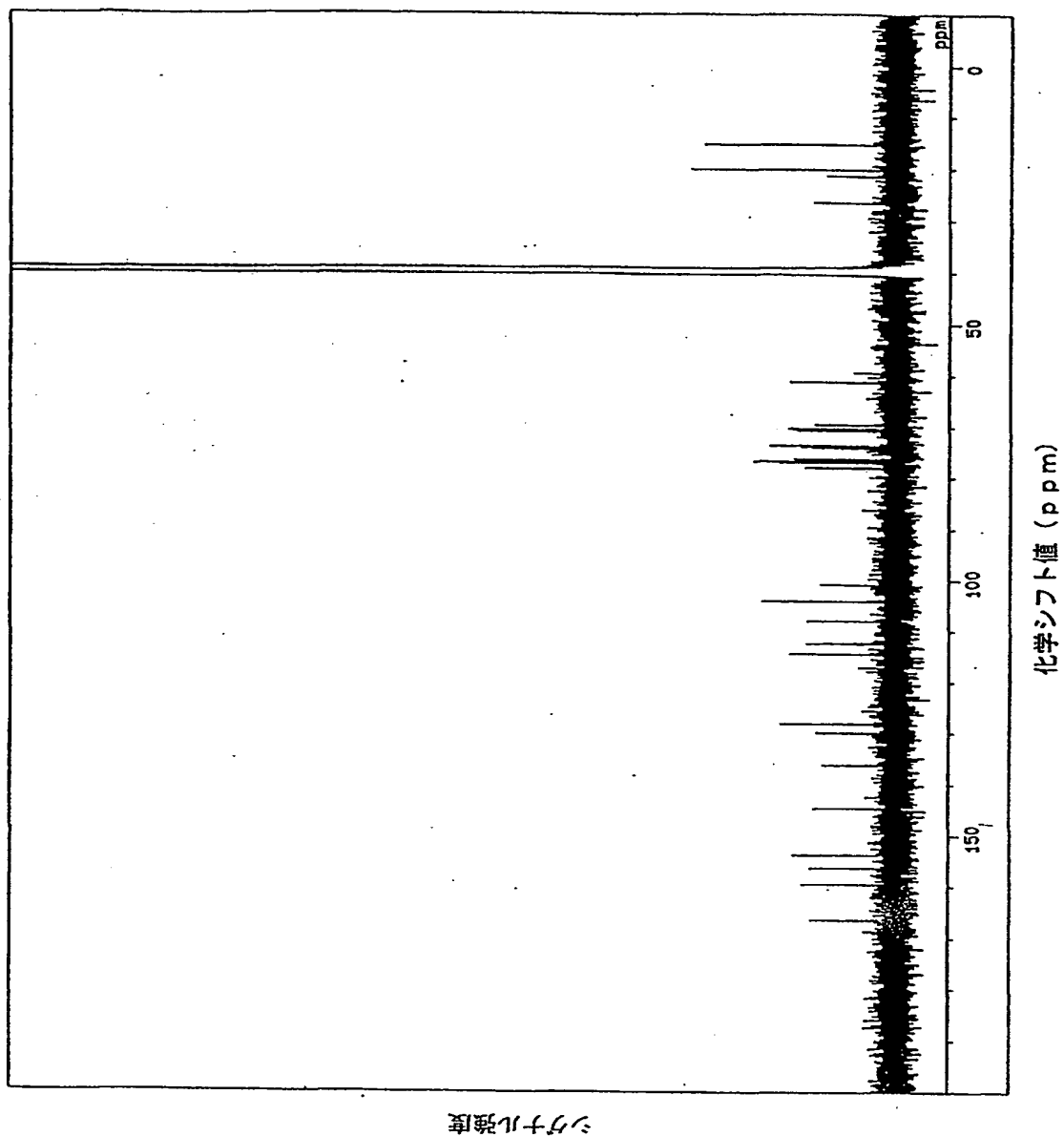
第 31 図



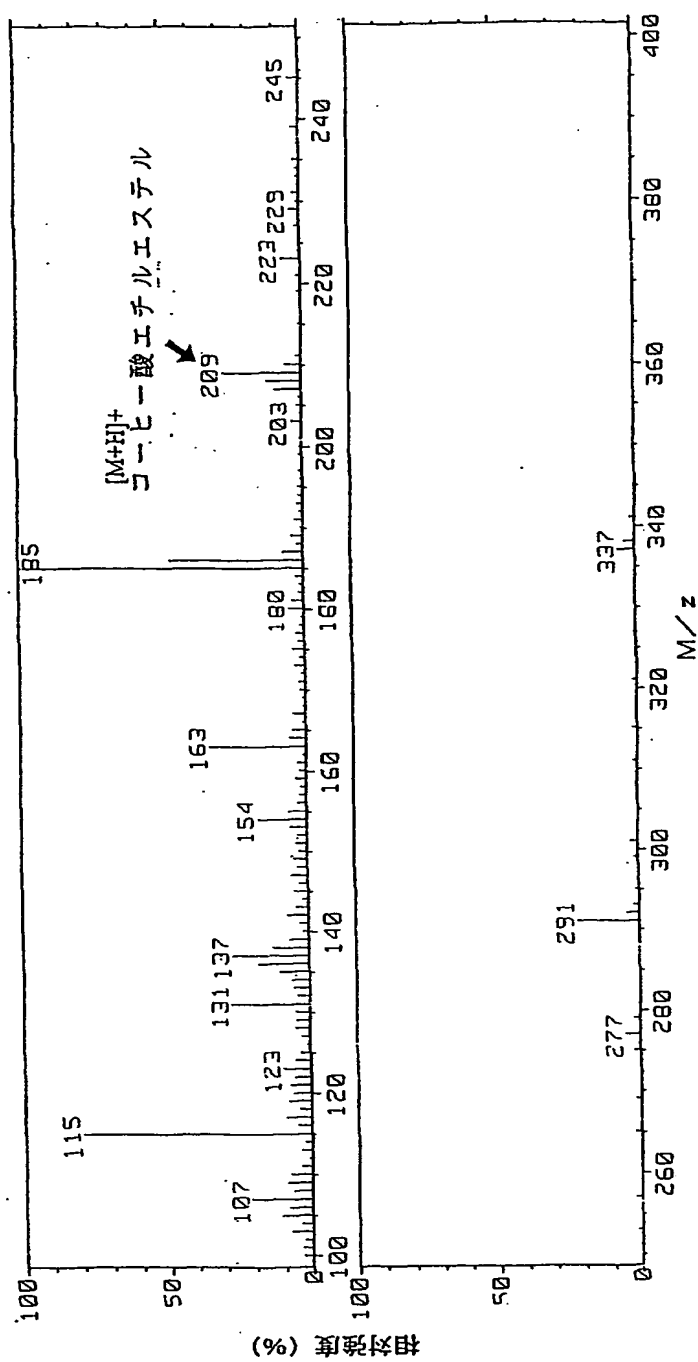
第 32 図



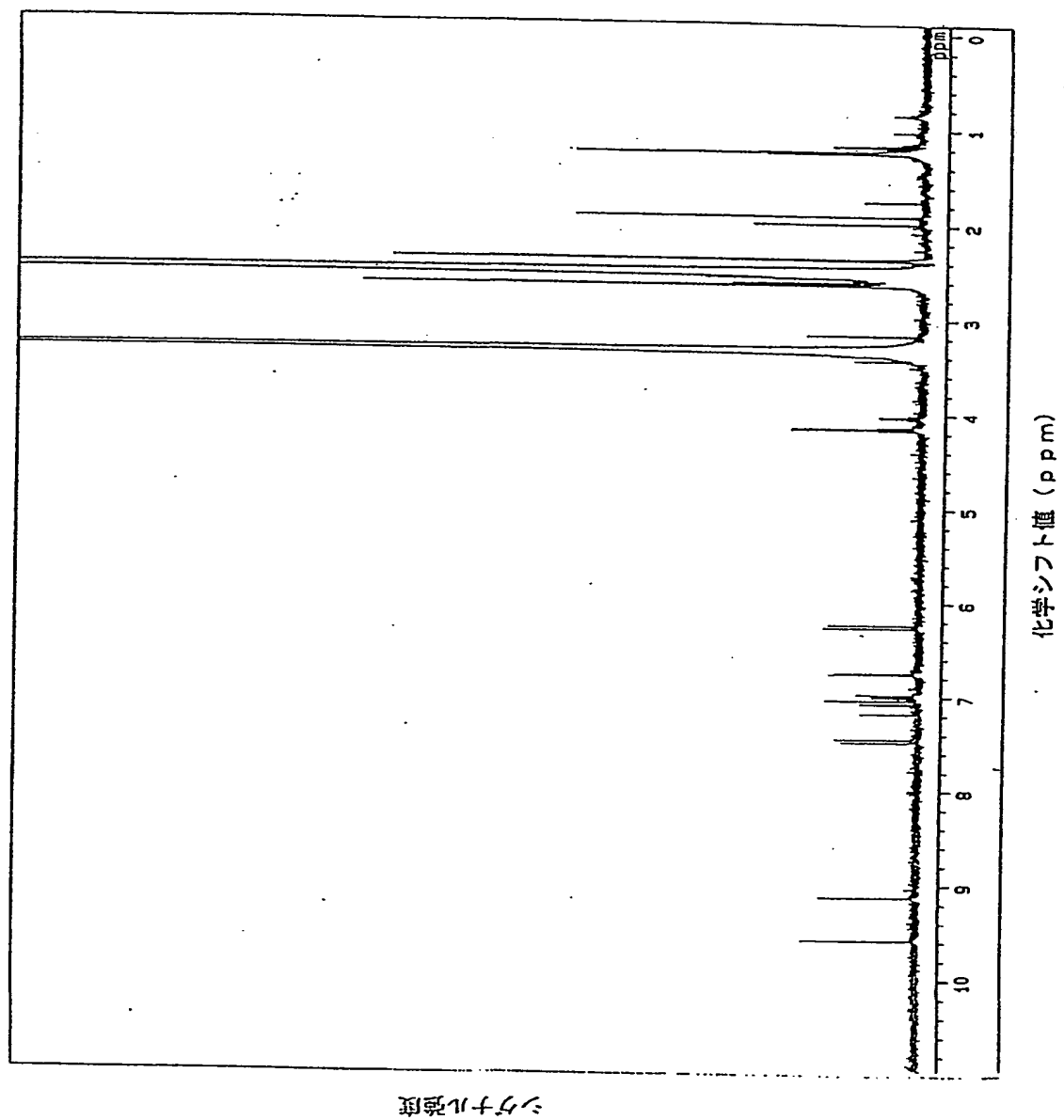
第 33 図



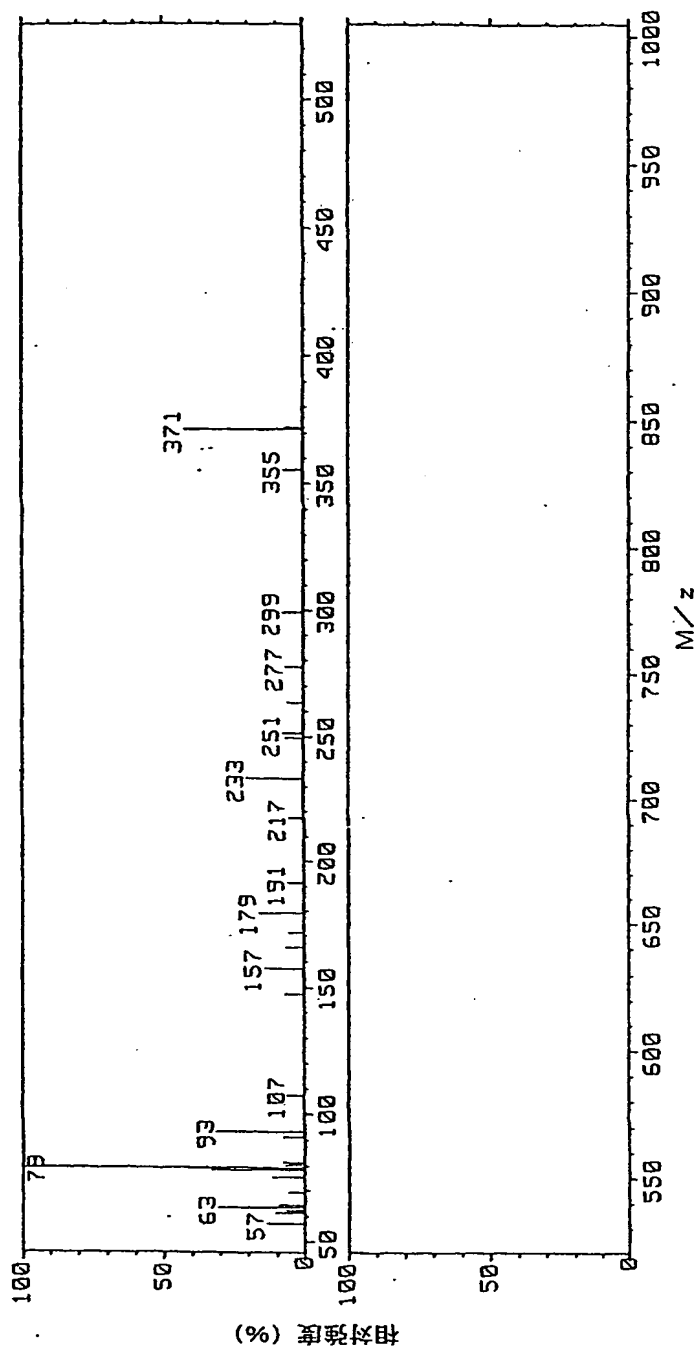
第 34 図



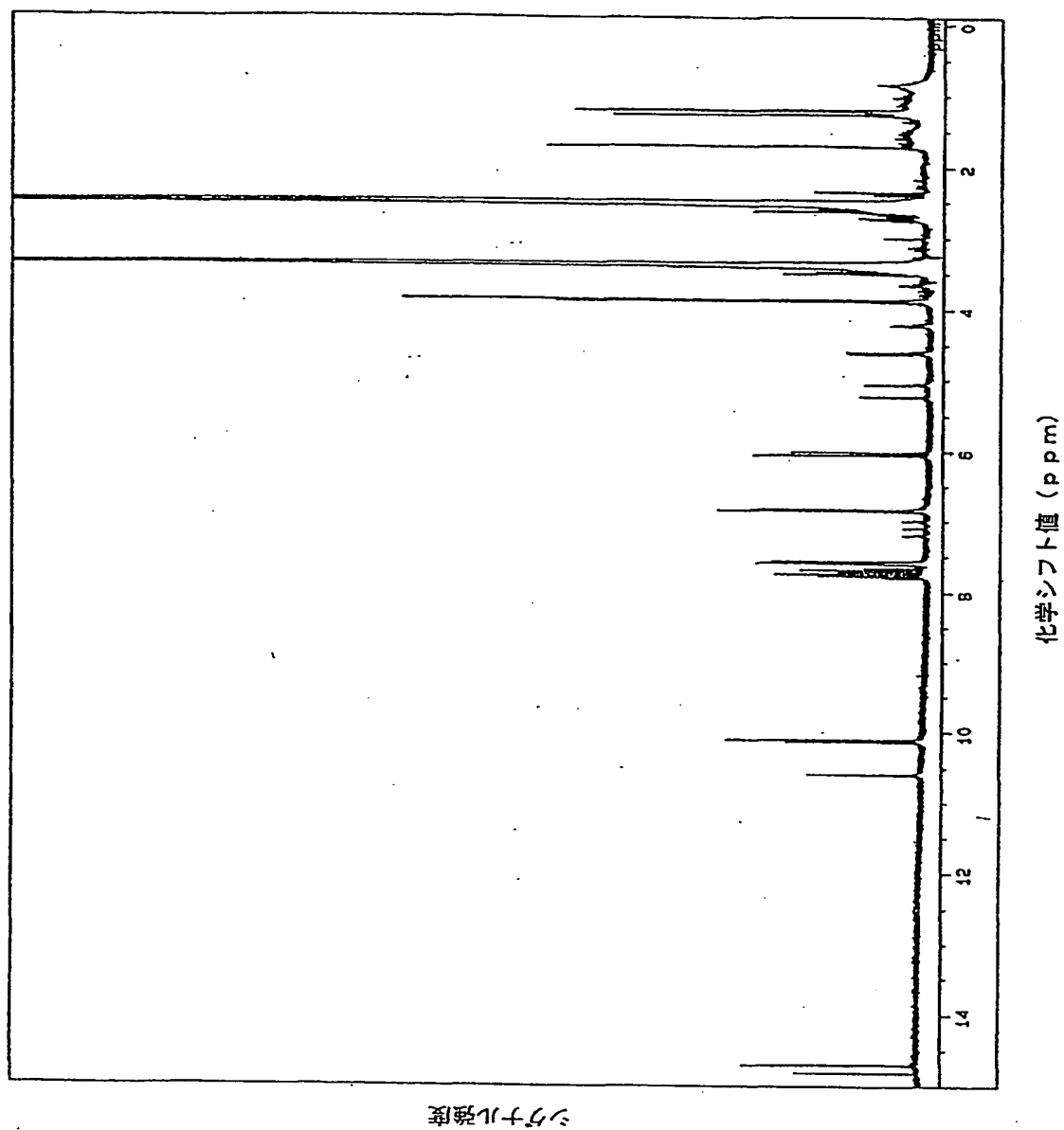
第 35 図



第 36 図

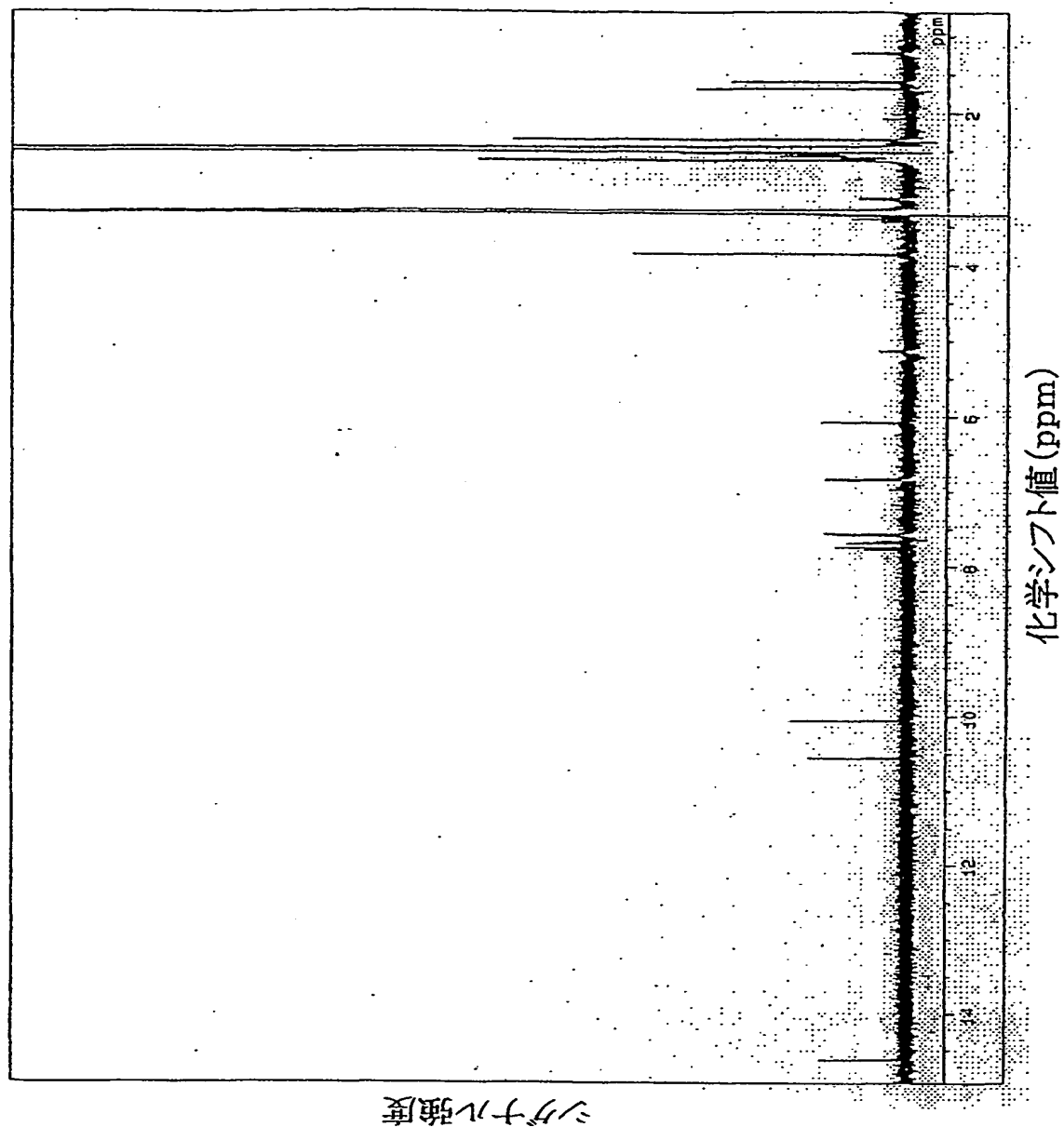


第 37 図



第 38 図





第 39 図

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03074

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K35/78, 31/216, 31/7048, 31/192, 31/12, A61P43/00,  
25/00, A23L2/00, 1/30, A23K1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K35/78, 31/216, 31/7048, 31/192, 31/12, A61P43/00,  
25/00, A23L2/00, 1/30, A23K1/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 4-210643, A (Kitsuen Kagaku Kenkyu Zaidan), 11 December, 1992 (11.12.92) (Family: none)	1-12, 14
X	Kimihiro MATSUNAGA et al., "Enhancement of the Nerve Growth Factor-Mediated Neurite Outgrowth from PC12D Cells by Chinese and Paraguayan Medicinal Plants", Biol. Pharm. Bull. (1999), Vol.22, No.7, pages 752 to 755, abstract	1, 2, 4-9, 11 14
X	Cáo Yuǎnmíng et al., "Kan Bubun Setsujo go Kan Saisei ni oyobosu Shokujisei ω 6 oyobi ω 3 kei Taka Fuhouwa Shibousan no Kouka no Jikkenteki Kenkyu; Geka to Taisha, Eiyō", (1996), Vol.30, No.5, pages 337 to 346, abstract	1, 2, 4-9, 11 14
X	Wei-Ran WU et al., "Involvement of monoamine oxidase in neuroprotective and neurorestorative effects of ginkgo biloba extract against mptp-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity in c57 mic", Life Sciences (1999), Vol.65, No.2, pages 157 to 164	1, 2, 4-9, 11 14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not  
 considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing  
 date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
 cited to establish the publication date of another citation or other  
 special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
 means  
 "P" document published prior to the international filing date but later  
 than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or  
 priority date and not in conflict with the application but cited to  
 understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
 step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
 considered to involve an inventive step when the document is  
 combined with one or more other such documents, such  
 combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 July, 2001 (06.07.01)

Date of mailing of the international search report  
17 July, 2001 (17.07.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03074

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 5-78384, A (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.), 30 March, 1993 (30.03.93) (Family: none)	1,2,4-9,11 14
PX	JP, 2001-158745, A (Nagase & Co., Ltd.), 12 June, 2001 (12 06 01) (Family: none)	1,2,4-9,11 14
PX	JP, 2001-55333, A (Hause Shokuhin Kogyo K.K.), 27 February, 2001 (27.02.01) (Family: none)	1,2,4-9,11 14
Y	WO, 98/9599, A (Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences of the PLA), 27 August, 1997 (27.08.97), & AU, 9740085, A & EP, 1008344, A & BR, 9711647, A & JP, 2000-517323, A	1-12,14
Y	JP, 9-194352, A (Nobuyoshi HAGINO), 29 July, 1997 (29.07.97) (Family: none)	1,2,4-9,11 14
Y	Kirov, M. et al., "Lipotropic effect of rose oil in fatty dystrophy of the liver", Med. Biol. Inf., (1988), Vol.3, pages 20 to 24	1,2,4-9,11 14
A	L. L. Gershbein, "Regeneration of Rat Liver in the Presence of Essential Oils and Their Components", Fd. Cosmet. Toxicol, (1977), Vol.15, pages 173 to 181	1,2,4-9,11 14

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K35/78, 31/216, 31/7048, 31/192, 31/12, A61P43/00, 25/00, A23L2/00, 1/30, A23K1/16

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K35/78, 31/216, 31/7048, 31/192, 31/12, A61P43/00, 25/00, A23L2/00, 1/30, A23K1/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 4-210643 A (財団法人喫煙科学研究財団) 11. 12月. 1992 (11. 12. 9 2) (ファミリーなし)	1-12, 14
X	Kimihiro MATSUNAGA et al, Enhancement of the Nerve Growth Fa ctor-Mediated Neurite Outgrowth from PC12D Cells by Chinese and Paraguayan Medicinal Plants, Biol. Pharm. Bull., 1999, Vol. 2 2, No. 7, p. 752-755 abstract参照	1, 2, 4-9, 11 14
X	曹 遠明 et al, 肝部分切除後肝再生におよぼす食餌性 $\omega$ 6 および $\omega$ 3 系多価不飽和脂肪酸の効果の実験的研究, 外科と代謝・栄養, 19 96, Vol. 30, No. 5, p. 337-346 abstract参照	1, 2, 4-9, 11 14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 07. 01

国際調査報告の発送日

17.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴見 秀紀

4C

8415

電話番号 03-3581-1101 内線 3452



C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Wei-Ran WU et al, involmment of monoamine oxidase in neuroprotective and neurorestorative effects of ginkgo biloba extract against mptp-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity in c57 mic, Life Science, 1999, Vol. 65, No. 2, p. 157-164	1, 2, 4-9, 11 14
X	JP 5-78384 A(大正製薬株式会社)30. 3月. 1993(30. 03. 93) (ファミリーなし)	1, 2, 4-9, 11 14
P X	JP 2001-158745 A(長瀬産業株式会社)12. 6月. 2001(12 06 01) (ファミリーなし)	1, 2, 4-9, 11 14
P X	JP 2001-55333 A(ハウス食品株式会社)27. 2月. 2001(27. 02. 01) (ファミリーなし)	1, 2, 4-9, 11 14
Y	WO 98/9599 A(INST RADIATION MEDICINE ACAD MILITARY ME)12. 3月. 1998(12. 03. 98)&AU 9740085 A&EP 1008344 A&BR 9711647 A&JP 2000-517323 A	1-12, 14
Y	JP 9-194352 A(ノブヨシ ハギノ)29 7月. 1997(29. 07. 97) (ファミリーなし)	1, 2, 4-9, 11 14
Y	Kirov, M et al, Lipotropic effect of rose oil in fatty dystrophy of the liver, Med. Biol. Inf., 1988, Vol. 3, p. 20-24	1, 2, 4-9, 11 14
A	L. L. GERSHBEIN, REGENERATION OF RAT LIVER IN THE PRESENCE OF ESSENTIAL OILS AND THEIR COMPONENTS, Fd Cosmet. Toxicol, 1977, Vol. 15, p. 173-181	1, 2, 4-9, 11 14

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**